

COTTON FIBER SPECIFIC GENE**Publication number:** JP9075093 (A)**Publication date:** 1997-03-25**Inventor(s):** KASUKABE YOSHIHISA; FUJISAWA KOICHI; NISHIGUCHI SUSUMU; MAEKAWA NOBUHIKO; RANDEI AREN**Applicant(s):** TOYO BOSEKI; UNIV TEXAS TECH [US]**Classification:**

- international: A01H1/00; A01H5/00; A01N49/00; C07H21/02; C07H21/04; C07K14/415; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/00; C12N15/02; C12N15/09; C12N15/82; C12P21/02; C12Q1/68; C12R1/19; C12R1/91; A01H1/00; A01H5/00; A01N49/00; C07H21/00; C07K14/415; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/00; C12N15/02; C12N15/09; C12N15/82; C12P21/02; C12Q1/68; (IPC1-7): C12N15/09; A01H1/00; A01H5/00; C07H21/02; C07H21/04; C07K14/415; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/02; C12P21/02; C12Q1/68; C12N15/09; C12R1/91; C12N1/21; C12R1/19; C12P21/02; C12R1/91

- European: A01N49/00; C07K14/415; C12N15/82C4; C12N15/82C8

Application number: JP19960031987 19960220**Priority number(s):** US19950391696 19950221; US19950580545 19951229**Also published as:**

JP3313964 (B2)

US6166294 (A)

Abstract not available for JP 9075093 (A)

Abstract of corresponding document: US 6166294 (A)

Cotton fiber tissue-specific genes disclosed herein are specifically expressed in a cotton fiber tissue at the stage of cotton fiber elongation. One of the genes was first derived from a cotton plant of the genus *Gossypium* and found to change the degree of its expression by treatment with a brassinosteroid.

```

GATCGCTG GCGCTTGT TGTGAAA AAAAGTC GGTGTAT GTTGCTG 70
GGTGTG GAGAGTC GTTGTC GATGAGC GAGAGTC TCGAGAG 100
ATGATGAA GAGATGAG TGTGATG AGGAGAG GAGAGAG TGGATGAA 120
ATGAGAG TGTGATG TGTGATG GATGATG TGTGATG GATGATG 140
1
1
1
1
1
GTTGTCG TGTGATG TGTGATG GATGATG GATGATG GATGATG 160
GATGATG GATGATG GATGATG GATGATG GATGATG GATGATG 180
GATGATG GATGATG GATGATG GATGATG GATGATG GATGATG 200
GATGATG GATGATG GATGATG GATGATG GATGATG GATGATG 220

```

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-75093

(43)公開日 平成9年(1997)3月25日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 0 1 H 1/00			A 0 1 H 1/00	A
5/00			5/00	A
C 0 7 H 21/02			C 0 7 H 21/02	
21/04			21/04	B
審査請求 未請求 請求項の数41 O L (全 37 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願平8-31987	(71)出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22)出願日	平成8年(1996)2月20日	(71)出願人	596022994 テキサス テック ユニバーシティ アメリカ合衆国テキサス州 ラブボック ホールデン ホール 203番地 オフィス オブ リサーチ サービスズ
(31)優先権主張番号	0 8 / 3 9 1 , 6 9 6	(72)発明者	春日部 芳久 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡 績株式会社総合研究所内
(32)優先日	1995年2月21日	(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名)
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
(31)優先権主張番号	0 8 / 5 8 0 5 4 5		
(32)優先日	1995年12月29日		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ワタ繊維組織特異的遺伝子

(57)【要約】

【解決手段】 ワタ繊維伸長時に特異的に発現するワタ繊維組織特異的遺伝子、並びにそれを利用した組み換えベクター、形質転換体及びワタ繊維の製造法。

【効果】 ワタ繊維の特性の改善、及び収量の向上を行うことができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ワタ繊維組織において、ワタ繊維伸長時に特異的に発現することを特徴とする単離されたワタ繊維組織特異的遺伝子。

【請求項2】 配列番号1、3、5、7または9に記載される塩基配列を含有する請求項1記載のワタ繊維組織特異的遺伝子。

【請求項3】 配列番号2、4、6、8または10に記載されるアミノ酸配列をコードする請求項1記載のワタ繊維組織特異的遺伝子。

【請求項4】 配列番号1記載の塩基配列を含有する請求項1記載のワタ繊維組織特異的遺伝子。

【請求項5】 配列番号2記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子を含む請求項1記載のワタ繊維組織特異的遺伝子。

【請求項6】 配列番号3記載の塩基配列を含有する請求項1記載のワタ繊維組織特異的遺伝子。

【請求項7】 配列番号4記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子を含む請求項1記載のワタ繊維組織特異的遺伝子。

【請求項8】 配列番号5記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子を含む請求項1記載のワタ繊維組織特異的遺伝子。

【請求項9】 配列番号6記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子を含む請求項1記載のワタ繊維組織特異的遺伝子。

【請求項10】 配列番号7記載の塩基配列を含有する請求項1記載のワタ繊維組織特異的遺伝子。

【請求項11】 配列番号8記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子を含む請求項1記載のワタ繊維組織特異的遺伝子。

【請求項12】 配列番号9記載の塩基配列を含有する請求項1記載のワタ繊維組織特異的遺伝子。

【請求項13】 配列番号10記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子を含む請求項1記載のワタ繊維組織特異的遺伝子。

【請求項14】 請求項1の遺伝子を部分的に置換または削除するか、あるいは他の遺伝子の挿入または付加した遺伝子であって、請求項1の遺伝子と同様の作用効果を有する遺伝子。

【請求項15】 請求項1記載の遺伝子とハイブリダイズ可能な遺伝子。

【請求項16】 請求項2記載の遺伝子とハイブリダイズ可能な遺伝子。

【請求項17】 請求項1記載の遺伝子のアンチセンス遺伝子。

【請求項18】 請求項2記載の遺伝子のアンチセンス遺伝子。

【請求項19】 ワタ繊維組織において、ワタ繊維伸長時に特異的に発現するワタ繊維組織特異的遺伝子または

該遺伝子のアンチセンス遺伝子を含む組み換えベクター。

【請求項20】 ワタ繊維組織において、ワタ繊維伸長時に特異的に発現するワタ繊維組織特異的遺伝子または該遺伝子のアンチセンス遺伝子を含む組み換えベクターによって、宿主細胞を形質転換した形質転換体。

【請求項21】 ワタ繊維組織において、ワタ繊維伸長時に特異的に発現するワタ繊維組織特異的遺伝子または該遺伝子のアンチセンス遺伝子を含む組み換えベクターによって、宿主細胞を形質転換した形質転換体を栽培し、得られたさく果からワタ繊維を採取することを特徴とするワタ繊維の製造法。

【請求項22】 ワタ繊維組織において、ワタ繊維伸長時に特異的に発現するワタ繊維組織特異的遺伝子の発現によって得られたタンパク質。

【請求項23】 配列番号2、4、6、8または10に記載されるアミノ酸配列を有する請求項22のタンパク質。

【請求項24】 ブラシノステロイドの処理によってその発現量が変化するゴシピウム(*Gossypium*) 属に属するワタ植物由来の遺伝子。

【請求項25】 ワタ繊維またはワタ植物の胚珠由来の請求項24記載の遺伝子。

【請求項26】 配列番号3に記載の塩基配列を有する請求項24記載の遺伝子。

【請求項27】 配列番号4に記載のアミノ酸配列をコードする請求項24記載の遺伝子。

【請求項28】 請求項24の遺伝子を部分的に置換または削除するか、あるいは他の遺伝子を挿入または付加した遺伝子であって、請求項1の遺伝子と同様の作用効果を有する遺伝子。

【請求項29】 請求項24の遺伝子とハイブリダイズし得る遺伝子。

【請求項30】 請求項24の遺伝子に対するアンチセンスDNA。

【請求項31】 請求項24の遺伝子に対するアンチセンスRNA。

【請求項32】 ブラシノステロイドの処理によってその発現量が変化するゴシピウム(*Gossypium*) 属に属するワタ植物由来の遺伝子を含む組換えプラスミド。

【請求項33】 ゴシピウム(*Gossypium*) 属に属するワタ植物由来の遺伝子が配列番号3記載の塩基配列を有する請求項32記載の組換えプラスミド。

【請求項34】 ゴシピウム(*Gossypium*) 属に属するワタ植物由来の遺伝子が配列番号4記載のアミノ酸配列をコードする請求項32記載の組換えプラスミド。

【請求項35】 請求項32記載の組換えプラスミドを含む形質転換体。

【請求項36】 請求項33記載の組換えプラスミドを含む形質転換体。

【請求項37】 請求項34記載の組換えプラスミドを含む形質転換体。

【請求項38】 ブラシノステロイドの処理によってその発現量が変化するゴシビウム(*Gossypium*) 属に属するワタ植物由来の遺伝子を含む組換えプラスミドで形質転換された微生物。

【請求項39】 形質転換された微生物が大腸菌およびアグロバクテリウム属細菌からなる群から選択されたものである請求項38記載の形質転換された微生物。

【請求項40】 ブラシノステロイドの処理によってその発現量が変化するゴシビウム(*Gossypium*) 属に属するワタ植物由来の遺伝子を含む組換えプラスミドで形質転換された植物。

【請求項41】 形質転換される植物がシロイナズナ(*Abrakinesis thaliana*)、ワタおよびタバコからなる群から選択されたものである請求項40記載の形質転換された植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ワタ繊維組織において、ワタ繊維伸長時に特異的に発現する遺伝子、該遺伝子のアンチセンス遺伝子およびその用途に関する。さらに、本発明はブラシノステロイドの処理によってその発現量が変化するワタ植物由来の遺伝子、該遺伝子のアンチセンス遺伝子およびその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】通常、ワタ繊維はゴシビウム属に属するワタ植物を栽培し、ワタ植物上に得られたさく果(コットンボール)から採取することにより製造する。ワタ植物には種々の品種があり、それぞれ異なった繊維特性を有するワタ繊維が得られ、その繊維特性に応じて各種用途に使い分けられている。ワタ繊維は種々の特性値によって特徴づけられるが、その中でも、特に重要なものとして、繊維長、繊維度、強度が挙げられる。従来より、ワタ繊維の特性を改善するため多大な努力がなされてきたが、その繊維特性を改善する中心は、繊維長と繊維度であった。その中でも、特により長く細い繊維が望まれてきた。このような繊維特性を有する品種としては、海島綿が有名であるが、しかし、この品種は生産性が低く、大変高価である。もし、海島綿と同等以上の繊維特性を有するワタ繊維をより高い生産性で得ることができれば、産業上非常に有益である。

【0003】ワタ繊維の繊維特性あるいは収量を改善させる方法としては、大きく分けて3つの方法がある。

1. 交配による品種改良

この方法は、従来より最もよく利用されてきた方法である。現在、ワタ植物の栽培品種として利用されているものは、ほとんど、この方法により育種されたものである。しかしながら、該方法は長い時間を要する上、品種を改善できるレベルに限度があり、繊維特性の改良およ

び生産性に飛躍的な向上はあまり期待できない。

【0004】2. 植物ホルモンによる処理

オーキシシン、ジベレリン、サイトカイニンおよびエチレン等の植物ホルモンは、農作物や園芸分野において幅広く実用化されている。ワタ植物の繊維生成、特に繊維伸長メカニズムに対する植物ホルモンの影響は、これまで数多く報告されている。ジベレリンやオーキシシンは繊維の伸長を誘導し、アブシジン酸は逆に繊維伸長を抑制すると考えられている(Bhardwaj and Sharma, 1972; Singh and Sing, 1975; Baert et al., 1975; Dhindsa et al., 1976; Kosmidou, 1976; Babaev and Agakishiev, 1977; Bazanova, 1977; DeLanghe et al., 1978)。また、Beasley and Ting [Amer. J. Bot. 60(2): 130-139, 1973] は、胚珠培養(in vitro)で、ジベレリンは繊維伸長に対して促進効果を示し、カイネチンとアブシジン酸は繊維伸長の抑制効果を示したと報告している。圃場試験(in vivo)では、不受精(non-fertilized)の開花直後の花に、ジベレリン処理を行ったところ、ある程度の繊維伸長に促進効果がみられたと報告されている。しかし、受粉(fertilized)の花ではジベレリン処理による有意な伸長促進効果は起こらなかった

(The Cotton Foundation Reference Book, Series Number 1, Cotton Physiology, 369, The Cotton Foundation, 1986)。

【0005】ワタ繊維の繊維収量に対する植物ホルモンの影響については、McCarty and Hedinは、1986～1992年の期間にわたって、商業用植物調節剤(commercial plant growth regulators)の圃場試験を行ったところ、1992年の圃場試験のみ、サイトカイニンを含む植物調節剤Foliar Trigger (Westbridge Chemical Co.製)と、サイトカイニン、インドール酢酸、ジベレリンを含む植物調節剤FPG-5 (Baldridge Bio-Research Inc., 製)で、繊維収量の増加が観察されたと報告している。しかし、他の年については有意な収量増加は観察されていない[J. Agric. Food Chem. 42: 1355-1357, (1994)]。

【0006】以上のように、ワタ繊維の繊維特性や生産性の向上を目指して、オーキシシン、ジベレリン、サイトカイニンおよびアブシジン酸などの従来の植物ホルモンについては数多く研究、報告されているが、その効果が十分確認されたとはいえず、実用的なものとはいえない。

【0007】近年、新しい植物ホルモンの1つとしてブラシノステロイドが注目されており、各種植物に対する、これらのホルモンの作用が研究されている。最初、ミッチェル、マンドーバらはセイヨウアブラナの花粉の中から、ブラシノステロイドの1種であるブラシノライドを発見し[Mitchell, J. W., N. Mandava, et al, Nature, 225, 1965, (1979)]、インゲンマメの若芽に使用することにより、きわめて顕著な細胞伸長作用があるこ

とが確認された。ブラシノライドは上記したように、複雑な構造を有するステロイド化合物の1種であり、その後、種々の植物から類似の構造をもつ植物ホルモンが発見されている。

【0008】ブラシノステロイドをワタ植物に適用した例としては、圃場試験 (in vivo) で Lu o ら (Plant Physiology Communications, 5, 31-34, 1988) は、0.01ppmと1ppmのブラシノライドを果梗に処理すると、子房の落果が抑制されたと報告している。しかし、これまでのところブラシノステロイドによって繊維特性や生産性が向上した例は報告されていない。

【0009】カルス培養 (in vitro) においては、Wang ら [Plant Physiology Communications, 28(1), 15-18, 1992] は、0.01ppmのブラシノライドをMS培地に添加することによって、ワタ植物においてカルス形成と胚形成が誘導されたと報告している。しかし、胚珠培養によるワタ繊維の製造においては、培地中にブラシノステロイドを添加することにより、ワタ繊維の繊維特性、収量が改善されたという例は報告されていない。

【0010】3. 遺伝子組換え技術を利用した品種改良
近年の遺伝子組換え技術の発達はめざましいものがあり、ある種の植物 (例えばワタ、トマト、ダイズなど) では、特定の遺伝子を導入、発現させることにより目的の形質に、その植物を品種改良することに成功した例が報告されている。例えばワタ植物ではBT毒素 (Bacillus thuringiensis産生殺虫性タンパク毒素) をコードする遺伝子を導入し、耐虫性の向上を目的としたもの、5-エノールピルビルシキミ酸-3- 燐酸合成酵素をコードする遺伝子を導入し、除草剤 (グリホセート) 耐性の向上を目的としたものが研究されている。もし、ワタ植物にワタの繊維形成および伸長に関与している遺伝子を導入し、大量発現させることができれば、その繊維特性あるいは生産性を飛躍的に改善することが可能となる。また、遺伝子をアンチセンスの形に組み込んで、その遺伝子の働きを抑制することも可能である。すなわち、繊維の形成や伸長に関与する遺伝子をワタ植物に導入し、大量発現させたり、抑制することにより繊維の伸長の制御を行うことが可能になるものと考えられる。このような遺伝子工学的手法を用いた方法では、従来の交配、選抜による育種よりも繊維伸長のより確実な制御およびその他幅広い応用を期待することができる。このためには繊維伸長時に活発に繊維特異的に発現している繊維伸長に関与する遺伝子を単離・同定しなければならない。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、現時点では植物の繊維伸長に関与する分子生物学的知見は非常に乏しい状態である。植物の細胞の伸長については、これまで多くの研究がなされているが、その制御要因には不明の点が多く、現在に至るまで制御機構は解明されていない。その原因としては、繊維伸長時に特異的に発現

し、かつ伸長している繊維組織特異的に発現している遺伝子の取得、取得した遺伝子の機能の検定が困難であることなどが挙げられる。したがって、本発明の目的は、ワタ繊維伸長時に、繊維組織において特異的に発現し、繊維伸長を制御する遺伝子を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するため、ワタ植物の繊維伸長時の繊維組織を利用して、繊維伸長時の分子生物学的研究を鋭意行なった。ワタ繊維は種子殻 (seed coat) の表皮細胞が分化した単細胞であり、ワタ繊維は4段階を経て成育する。すなわち、伸長開始 (initiation)、伸長 (elongation)、2次細胞壁厚化 (secondary cell wall thickening)、熟成 (maturation) の段階を経て成育する。より具体的には、ワタ繊維の伸長は胚珠の表皮細胞が、開花直後より繊維伸長を開始し、その後、急速に繊維が伸長し、開花後、25日程度で伸長が完了する。それ以後、繊維の伸長は停止し、2次細胞壁が生成され熟成を経て、成熟した1本のワタ繊維になる。繊維の成育過程の中で繊維伸長段階の胚珠、特に繊維組織の遺伝子の発現を調べることは、繊維の伸長機構の解明で有効な手段であると考えられる。

【0013】このようなワタ繊維から遺伝子の取得について、いくつかの試みがなされている。繊維細胞で活発に働く遺伝子の多くは、葉、胚珠、あるいは根にあるものとよく似ているが、ディファレンシャルスクリーニング法により、繊維組織にプレファレンシャルに発現している遺伝子の取得について報じられている (Maliyakkal E. John and Laura J. Crow, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5769 (1992))。しかし、まだ繊維特異的な遺伝子の報告は少ない。近年、種々の細胞あるいは特定の条件で特異的に発現している遺伝子を分離するための有効な方法として、ディファレンシャルディスプレイ法が報告されている。しかし、ディファレンシャルディスプレイ法によるワタ繊維特異的な遺伝子の単離についての報告はない。

【0014】このような状況下、本発明者らはワタ繊維の特性および収量を改良するために鋭意、検討した結果、ブラシノステロイド処理によって、その発現量を変化させ得るワタ植物遺伝子を見だし、該遺伝子はワタ繊維の形成および伸長に関与していることを解明した。その後、さらに検討した結果、ワタ繊維特異的な遺伝子の単離および同定に成功し、本発明を完成するに至った。

【0015】すなわち、本発明はブラシノステロイド処理によって、その発現量が変化し得るゴシビウム (Gossypium) 属に属するワタ植物由来の遺伝子およびワタ繊維伸長時に、ワタ繊維組織において特異的に発現することを特徴とするワタ繊維組織特異的な遺伝子である。これらのワタ繊維特異的な遺伝子の1つはブラシノステロイド処理によって、その発現量が変化し得るワタ植物遺伝子の

塩基配列と同じであることが見いだされた。

【0016】また、本発明は上記遺伝子から誘導される種々の遺伝子、例えば上記遺伝子とハイブリダイズし得る遺伝子、該遺伝子のアンチセンス遺伝子、上記遺伝子を含む組換えベクター、これらの組換えベクターの形質転換により得られた形質転換体、上記遺伝子の発現により得られるタンパク質および上記遺伝子の使用によるワタ繊維の製造法である。

【0017】

【発明の実施の形態】本発明の「ワタ繊維組織特異的遺伝子」とは、ワタ繊維組織において、ワタ繊維伸長時に特異的に発現する遺伝子であり、ここでいう「ワタ繊維組織」とは、開花直後の胚珠の表皮細胞がわずかに伸長したものから成熟した1本の繊維までのワタ繊維組織である。「ワタ繊維伸長時」とは、開花直後から開花後、25日の期間を意味する。また、本発明ワタ繊維組織特異的遺伝子には、ワタ繊維組織において、ワタ繊維伸長時に特異的に発現する遺伝子と50℃で、かつ塩濃度、6×SSC (0.9MNaCl, 0.09Mクエン酸 3-ナトリウム) であるハイブリダイゼーション条件下にハイブリダイズ可能な遺伝子も包含される。

【0018】本発明のワタ繊維組織特異的遺伝子としては、例えば配列番号2、4、6、8または10記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子などがある。該ワタ繊維組織特異的遺伝子は、例えば配列番号1、3、5、7または9記載の塩基配列を含有する。

【0019】本発明における「アンチセンス遺伝子」はワタ繊維組織において、ワタ繊維伸長時に特異的に発現するワタ繊維組織特異的遺伝子の塩基配列に相補的な配列を有する遺伝子を意味する。アンチセンスDNAは、例えば配列番号1、3、5、7または9の塩基配列に相補的なものであり、アンチセンスRNAはそれらから産生されるものである。

【0020】まず、本発明者らはゴシビウム属(*Gossypium*) 属に属するワタ植物から、ブラシノステロイド処理によって、その発現量が変化し得る遺伝子を見出した。その後、ワタ繊維組織において、繊維伸長時に特異的に発現するいくつかの遺伝子を得、上記ワタ植物遺伝子がこれらのワタ繊維特異的遺伝子に包含されることを見いだした。

【0021】ここで、「ブラシノステロイド処理によって、その発現量が変化し得る遺伝子」とは、該植物がブラシノステロイドで処理された場合、該植物中で異なったレベルで発現する遺伝子を意味する。

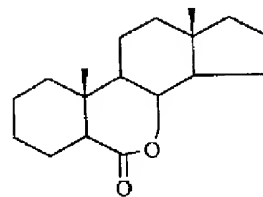
【0022】ゴシビウム属(*Gossypium*) 属に属するワタ植物としては、例えばゴシビウム・ヒルスツム(*G.hirsutum*)、ゴシビウム・バルバデンセ(*G.barbadense*)、ゴシビウム・アルボレウム(*G.arboreum*)、ゴシビウム・アルムリアヌム(*G.armourianum*)、ゴシビウム・クロツツキアヌム(*G.klotzchianum*)、およびゴシビウム・レモンデ

ィ(*G.raimondii*) などが含まれる。

【0023】本発明の方法において使用する「ブラシノステロイド」とは、以下のように異なったステロイド骨格を有する種々の化合物を含む。ブラシノライド(2 α , 3 α , 22R, 23R-テトラヒドロキシ-24S-メチル-B-ホモ-7-オキサ-5 α -コlestan-6-オン)、ドリコライド、ホモドリコライド、24-エピブラシノライド、28-ノルブラシノライドなどの第1タイプの化合物は、下記式のステロイド骨格を有する。

【0024】

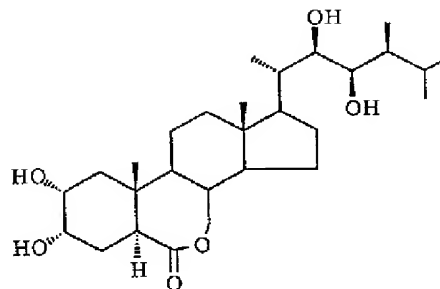
【化1】



【0025】例えばブラシノライドは下記化学構造式で示される。

【0026】

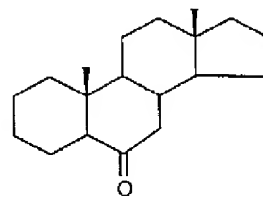
【化2】



【0027】例えば、カステステロン、ドリコステロン、ホモドリコステロン、ホモカステステロン、28-ノルカステステロン、ティファステロール、テアステロール、24-エピカステステロン、2-エピカステステロン、3-エピカステステロン、3, 24-ジエピカステステロン、25-メチルドリコステロン、2-エピ-25-メチルドリコステロンおよび2, 3-ジエピ-25-メチルドリコステロンなどの第2タイプの化合物は、下記式のステロイド骨格を有する。

【0028】

【化3】

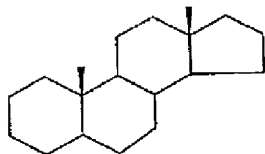


【0029】例えば、6-デオキシカステステロン、6-デオキシドリコステロンおよび6-デオキシホモドリコ

ステロンなどの第3タイプの化合物は、下記式のステロイド骨格を有する。

【0030】

【化4】



【0031】本発明のワタ繊維特異的遺伝子は、通常のディファレンシャルスクリーニング法あるいはディファレンシャルディスプレイ法などによって得ることができる。ディファレンシャルスクリーニング法とは、目的の細胞群と対照となる細胞群の間での転写産物の量的、質的な差を利用し、目的の細胞群で特異的に発現しているクローンを選抜する方法である。ディファレンシャルディスプレイ法とは、PCRを利用した方法であり、種々の細胞、あるいは特定の条件で特異的に発現している遺伝子を分離するための有効な技術として報告されている (Liang and Pardee, Science 257, 967 (1992); Liang et al., Nucleic Acids Research, 21, 3269 (1993))。この技術の要点は、3'-anchored oligo(dT) またはランダムプライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成する。得られたcDNAをテンプレートとして、ランダムな配列をもつ10merか12merのプライマーを用いて、PCR反応を行う。PCR産物をゲル電気泳動で分離、解析する。ある細胞特異的なPCR断片は、その細胞に特異的なmRNAを反映しているはずである。

【0032】本発明において、ディファレンシャルスクリーニング法とは、繊維伸長期の細胞群と繊維停止期の細胞群の間での転写産物の量的、質的な差を利用し、繊維伸長期で特異的に発現しているクローンを選択する方法である。

(1) ディファレンシャルスクリーニング法による繊維特異的遺伝子の単離

(1) cDNAライブラリーの構築

開花後、5日目のワタの胚珠から常法に従い、poly(A)+RNAを抽出する。単離したpoly(A)+RNAを鋳型として、オリゴ(dT)プライマーと逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、ポリメラーゼ反応によって2本鎖化したDNAを得る。該2本鎖DNAをベクターに挿入し、大腸菌等の宿主細胞に形質転換することにより、cDNAライブラリーを作製する。このpoly(A)+RNAの単離、cDNAの合成は、市販のcDNAクローニングキットを使用してもよい。また、ライブラリーの作成に用いるベクターとしては、λZAPII、λgt10、λgt11などが例示される。また、宿主細胞としては、大腸菌XL-1 Blue、大腸菌XL-1

Blue MRF'、大腸菌 SURE などが例示される。

【0033】(2) ライブラリーからの目的遺伝子のスクリーニング

上記(1)の方法で作製したcDNAライブラリーのフェージブランクからレプリカした2枚のフィルターに、開花後、5日目の胚珠から上記(1)と同様な方法で調製したcDNAと、開花後、25日目の胚珠から調製したcDNAを放射性同位元素である³²Pで標識したものを各マブローブとしてハイブリダイズさせ、開花後、5日目の胚珠cDNAから調製したブローブのみ陽性を示すシグナルを検出することにより、目的遺伝子のcDNAを選抜することができる。RNAの単離、cDNAの調製、DNAの切断、連結、形質転換、ハイブリダイゼーションなどの一般の遺伝子組換えに必要な方法は常法に従う。例えば各操作に使用する市販の酵素等に添付されている説明書や、Molecular cloning (Maniatisら編集、Cold Spring Harbor社、1989)あるいは Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubelら編集、John Wiley & Sons, Inc., 1987)に記載されている方法に従う。クローン化されたcDNAの塩基配列の決定は、Maxam-Gilbert法あるいは、ダイデオキシ法等により決定できる。いずれの方法も市販されているキットを用いて行うことができ、配列決定を自動的に行うオートシーケンサーを使用してもよい。もし、決定されたcDNAクローンが完全長の遺伝子でない場合は、常法に従って、再度ブランクハイブリダイゼーション、又はRACE (rapid amplification of cDNA ends) 法などにより完全長の遺伝子を得ることができる。

【0034】(2) ディファレンシャルディスプレイ法による繊維特異的遺伝子の単離

(1) 目的遺伝子の単離

開花後、8日目の綿植物の繊維組織より常法に従い、全RNAまたはポリ(A)+RNAを抽出する。他方、同様に開花後、8日目のワタ繊維を取り除いた胚珠あるいは開花後、35日目のワタ植物の種子から全RNAまたはポリ(A)+RNAを抽出する。このように抽出した全RNAまたはポリ(A)+RNAからアンカーオリゴ(dT)プライマーまたは2つのヌクレオチドを付加したオリゴ(dT)プライマーを用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成する。この調製したcDNAをテンプレートとして、cDNA合成に用いたのと同じアンカーオリゴ(dT)プライマーおよびランダムプライマーを使用して、PCR反応を行う。PCR産物をゲル電気泳動で分離し、繊維を除去した胚珠からのPCR産物ではなく、開花後、8日目の綿植物の繊維組織より得た全RNAまたはポリ(A)+RNAからのPCR産物に特異的に出現しているバンドの有無を解析する。その後、PCR産物はクローニングベクターに連結させる。

【0035】さらに、上述した方法で取得した遺伝子が繊維伸長時期特異的であり、かつ繊維組織特異的である

ことを確認するため、ワタの他の組織、例えば各時期の茎、葉、根、種子などから取得したmRNAとプローブとしてcDNAを用いて、ノザンハイブリダイゼーションを行ない、繊維伸長時期に、繊維組織において特異的に発現する遺伝子であることを確認する。このようにして取得した遺伝子は、繊維の伸長に関与している遺伝子であり、この遺伝子を利用して、巧妙に、即ち、遺伝子発現を分子生物学的に制御することにより、用途に合致した満足すべき繊維特性をもつワタ繊維の生産に利用することが可能になる。

【0036】(3)ワタ繊維形成及び伸長に関する遺伝子の利用

上記方法により得られた目的遺伝子を用いて、ワタ又はワタ以外の植物において、繊維形成及び伸長に関与するタンパク質の大量生産に利用することができる。また、目的遺伝子の中にはシグナルペプチドをコードするDNA配列も含まれているので、これらを利用して、細胞壁での各種タンパクの発現による細胞壁成分の改変が可能となり、耐病性等を付与した新規植物の育種にも応用できる。例えば、繊維形成及び伸長に関与する遺伝子を適当なプロモーターに接続して、ワタ植物あるいは他の植物に導入すると、目的タンパク質の含量を増大させることができる。これに対し、前記遺伝子のアンチセンス鎖(コード配列に相補的な配列)の少なくとも一部を逆向きにプロモーターに接続したもの(を植物に導入し、いわゆるアンチセンスRNAを発現させると、目的タンパク質含量を低下させることができる。また、シグナルペプチドをコードするDNA配列に他の遺伝子を接続したものを植物に導入すると、その遺伝子産物を細胞壁に効率よく移行させることができる。

【0037】植物の形質転換方法としては、プロトプラストに電気パルス処理してプラスミドを導入するエレクトロポレーション法や、小細胞、細胞、リソソーム等とプロトプラストとの融合法、マイクロインジェクション法、ポリエチレングリコール法、あるいはパーティクルガン法等の方法を挙げることができる。また、植物ウイルスをベクターとして利用することによって、該目的遺伝子を植物体に導入することができる。利用する植物ウイルスとしては、例えばカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)を用いることができる。すなわち、まずウイルスゲノムを一旦大腸菌等由来のベクターに挿入して組換え体を調製した後、ウイルスゲノム中にこれらの目的遺伝子を挿入する。このようにして修飾されたウイルスゲノムを制限酵素により、該組換え体から切り出し、植物に接種することによって、これらの目的遺伝子を植物体に挿入することができる【ホーン(Hohn)ら、モレキュラー・バイオロジー・オブ・プラント・チューモアーズ(Molecular Biology of Plant Tumors)、アカデミック・プレス、ニューヨーク(Academic Press, New York)、第549〜560頁(1982)、米国特許第4,407,956号】。

【0038】さらに、アグロバクテリウムのTiプラスミドを利用する方法がある。アグロバクテリウム属に属する細菌が植物に感染すると、それが持っているプラスミドDNAの一部を植物ゲノム中に移行させるという性質を利用して、これらの目的遺伝子を植物体に導入することもできる。アグロバクテリウム属に属する細菌のうち、アグロバクテリウム・ツメファシエンシス(*Agrobacterium tumefaciens*)は植物に感染してクラウンゴールと呼ばれる腫瘍を、アグロバクテリウム・リゾゲネス(*Agrobacterium rhizogenes*)は植物に感染して毛状根を引き起こすが、これらは感染の際にTiプラスミド、又はRiプラスミドと呼ばれる、それぞれの細菌中に存在するプラスミド上のT-DNA領域(Transferred DNA)と呼ばれる領域が植物中に移行し、植物のゲノム中に組み込まれることに起因する。さらに、TiプラスミドまたはRiプラスミド上にはT-DNA領域が植物中に移行し、植物ゲノム中に組み込まれるために必須であるvir領域といわれる領域がある。vir領域自身は、植物中に移行されることはなく、また、このvir領域はT-DNA領域が存在するのとは異なったプラスミド上にあっても機能しうる[Nature, 303, 179, (1983)]。

【0039】TiプラスミドまたはRiプラスミド上のT-DNA領域中に、植物ゲノム中に組み込みたいDNAを挿入しておけば、アグロバクテリウム属の細菌が植物体に感染する際に目的とするDNAを植物ゲノム中に組み込みことができる。ここで、TiプラスミドまたはRiプラスミドのT-DNA中のクラウンゴール、又は毛状根を引き起こす部分を、目的とする移行機能を損なうことなく、取り除き、得られたものをベクターとして使用することもできる。本発明においては、このような種々のベクターを用いることができる。例えば、バイナリーベクターと呼ばれるpBI121(クローンテック社)等のベクターに、適当なプロモーターに繊維形成および伸長に関与する遺伝子を接続したもの、さらに該遺伝子をアンチセンス方向に接続したものを挿入して、これらを植物体に導入することができる。なお、これらのベクターは前出のvir領域を有しておらず、該ベクターを導入して用いるアグロバクテリウム属の細菌は、vir領域を有している他のプラスミドを含有している必要がある。また、これらのベクターはアグロバクテリウム属の細菌だけではなく、大腸菌中でも増幅することができるシャトルベクターであり、したがって、Tiプラスミドの組換え操作は、大腸菌を用いて行うことができる。さらに、これらのベクターは抗生物質耐性遺伝子を含んでおり、大腸菌、アグロバクテリウム属の細菌、および植物体等を形質転換する際に、形質転換体を容易に選別することができる。また、これらのベクターにはカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーターが存在しており、これらのベクターに挿入された遺伝子を植物ゲノム中に組み込んだ後、非調節的に発現させ

ることが可能となる。

【0040】以下に、シロイヌナズナにおけるアグロバクテリウムによる目的遺伝子の導入、および形質転換体細胞の植物体への再生法を例示する。シロイヌナズナの種子を常法に従って、MSOプレート（ムラシゲースクーク無機塩類4.6g、ショ糖10g、1000×ビタミンストック液1ml／リットル、pH6.2）に播種し、無菌的に栽培する。発根した根の切片を用いてCIMプレート（MSOプレートに2,4-ジクロロフェノキシ酢酸を終濃度0.5μg/ml、カイネチンを0.05μg/mlとなるように加えたもの）上でカルス培養を行う。プロモーターに目的遺伝子を接続し、カナマイシン及びハイグロマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドにより形質転換したアグロバクテリウムを培養し、希釈したものをチューブに分注し、カルス化した根の切片を浸し、数日間CIMプレート上で共存培養する。菌株が肉眼で観察できるまで十分に増殖したら、除菌操作を行い、SIMCプレート（MSOプレートに、N⁶-[2-イソペンテニル]アデニンを終濃度5μg/ml、インドール酢酸（IAA）を終濃度0.15μg/ml、クラフオランを終濃度500μg/mlとなるように加えたもの）上で数日間培養を行う。これらの切片を最終的にSIMCSプレート（カナマイシンおよびハイグロマイシンBを含有するプレート）上で培養し、1週間ごとに新しいプレートに移植を繰り返す。

【0041】形質転換した切片は増殖を続け、カルスが現れてくる。抗生物質で選択しているため、非形質転換切片は褐変する。形質転換体が5mm程度の大きさになり、シュートを形成するまで培養する。完全なシュートの形状を示すようになったら、形質転換体の根元をカルス部分を含まないようにメスで切り取り、RIMプレート（MSOプレートにIAAを終濃度0.5μg/mlとなるように加えたもの）に移植する。大きなカルスが付いていると、発根してもカルスを介して根が出ていて、シュートとは維管束が繋がっていることが多い。約8～10日後、無機塩類培地〔5mM KNO₃、2.5mM K-リン酸緩衝液（pH5.5）、2mM MgSO₄、2mM Ca(NO₃)₂、50μM Fe-EDTA、1000×微量元素（70mM H₃BO₃、14mM MnCl₂、0.5mM CuSO₄、1mM ZnSO₄、0.2mM NaMoO₄、10mM NaCl、0.01mM CoCl₂）1ml／リットル〕に浸したロックウール上に定植する。開花し、莢を形成した植物体は無機塩類培地に浸した土に移植し、種子を得ることができる。この種子を滅菌処理し、MSH（MSOプレートのハイグロマイシンBを終濃度5U/mlとなるように加えたもの）に播種して発芽させることにより形質転換体を得ることができる。

【0042】この形質転換体より、常法に従ってDNAを抽出し、このDNAを適当な制限酵素で切断し、繊維

形成および伸長に関与する遺伝子をプローブとして用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、形質転換の有無を確認することができる。また、形質転換体や、非形質転換体より、常法に従ってRNAを抽出し、繊維形成および伸長に関与する遺伝子のセンス配列、もしくはアンチセンス配列を有するプローブを作成し、これらのプローブを用いてノザンハイブリダイゼーションを行い、目的遺伝子の発現の状態を調べることができる。

【0043】繊維形成及び伸長に関与する遺伝子はワタ繊維組織において、ワタ繊維形成過程で特異的に発現し、繊維伸長に関与するため、この塩基配列をワタ繊維による伸長のマーカーとして利用して、繊維伸長のメカニズムの解明およびそれを調節する遺伝子の単離を可能にするものである。従って、もし、この遺伝子の塩基配列を繊維形成及び伸長のマーカーとして使用すれば、繊維伸長のメカニズムの解明およびそれを調節する遺伝子の単離が達成されるであろう。

【0044】繊維形成及び伸長に必要である目的タンパク質（それはワタ繊維の形成および伸長のマーカーとして利用する）を用いることにより、繊維形成及び伸長を誘導する技術の確立及び繊維形成及び伸長のメカニズムの解明及び繊維伸長制御遺伝子の単離に利用することができる。したがって、本発明は細胞形成及び伸長の技術分野においてもきわめて有用である。

【0045】さらに、繊維形成及び伸長に関与するタンパク質をコードしている塩基配列は、インビトロの転写系などの人工的な手法、あるいは大腸菌などの微生物を用いて遺伝子の発現を行うことによって、繊維形成及び伸長に関与するタンパク質を大量に、かつ純粋な形で得ることができる。得られたタンパク質は繊維形成及び伸長に関与するタンパクであることから、植物細胞壁の構造を変化させることができ、工業分野で用いられる植物原料の加工に有用である。

【0046】本発明のこれらの遺伝子は、繊維形成及び伸長に関与する遺伝子であることから、植物細胞生長過程に関与する基幹遺伝子であると考えられる。例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターを用いることによって、植物の器官全体に生活環の全過程を通して形態変化をもたらすことができる。光、熱、傷害などの調節性のプロモーターを用いれば、生育環境に応じて、その形態が変化しうる植物体を作製することができる。また、器官、組織特異的なプロモーターを用いれば、特定の器官、又は組織だけに形態変化を生じさせることができ、植物の茎の伸長を制御することも可能である。さらに、繊維形成時にだけ転写を起こさせ得るプロモーターを用いることによって、繊維の形成を制御し、繊維特性の変化をもたらすことができる。

【0047】

【発明の効果】本発明により、ワタ繊維の特性（繊維長、繊維度、強度等）の改善及び、収量の向上を行うこと

ができる。さらに本発明の遺伝子を利用することにより、より優れた繊維特性を有し、且つ生産性の高い新規ワタ品種を作出することができる。

【0048】

【実施例】以下、実施例を用いて本発明を説明する。

実施例1 ディファレンシャルスクリーニング法によるワタ繊維形成に関与する遺伝子のクローニング

(1) ポリ(A)+RNAの調製

圃場に栽培しているスーピマ(*G. barbadense*)を供試材料に用いた。開花後、5日目の胚珠と対照サンプルとして、開花後、25日目の胚珠を採取した。約5gの胚珠を直ちに液体窒素中で凍結し、液体窒素存在下乳鉢で細かく粉砕した。その後、10mlの抽出用0.2Mトリス酢酸緩衝液〔5Mグアニジン・チオシアネート、0.7%β-メルカプトエタノール、1%ポリビニルピロリドン(分子量360,000)、0.62% N-ラウロイルザルコシン・ナトリウム塩、pH8.5〕を加え、ポリトロンホモジナイザー(KINEMATICA社製)を用い、氷冷下、2分間粉砕した。ただし、β-メルカプトエタノールとポリビニルピロリドンは使用する直前に添加した。その後、粉砕液を17,000×gで20分間遠心分離し、上清を回収した。

【0049】この上清をミラクロスにて渦渦し、その渦液を超遠心分離管に入れた5.7M塩化セシウム溶液1.5mlに静かに重層し、155,000×g、20℃で20時間遠心した後、上清を捨てRNAの沈殿を回収した。この沈殿を3mlの10mMTris-HCl、1mMEDTA・2Na、pH8.0(TE緩衝液と呼ぶ)に溶解し、さらに等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(容積比、25:24:1)を加え、良く混合した後、遠心分離を行って上層の水層を回収した。得られた水層に、1/10倍量の3M酢酸ナトリウム(氷酢酸でpH6.2に調製)と、2.5倍量のエタノールを添加して良く混合し、-20℃で一晩静置した。その後、17,000×gで20分間遠心分離し、得られた沈殿を70%エタノールで洗浄して、減圧乾燥した。

【0050】この乾燥標品を500μlの前述のTE緩衝液に溶解し、全RNA溶液を得た。このRNA溶液を65℃で5分間インキュベートした後、氷上で急冷した。これに2×結合緩衝液(10mM Tris-HCl、5mMEDTA・2Na、1M NaCl、0.5% SDS、pH7.5)を等量になるようにRNA溶液に加え、平衡化緩衝液(10mM Tris-HCl、5mMEDTA・2Na、0.5M NaCl、0.5% SDS、pH7.5)で予め平衡化したオリゴdTセルロースカラム(Clontech社製)に重層した。次いで、カラムを約10倍量の前述の平衡化緩衝液で洗浄した後、溶出緩衝液(10mM Tris-HCl、5mMEDTA・2Na、pH7.5)でポリ(A)RNAを溶出した。

【0051】得られた溶出液に、1/10倍量の前述の3M酢酸ナトリウム水溶液と2.5倍量のエタノールを加えて混合し、-70℃で静置した。その後、10,000×gで遠心分離を行ない、得られた沈殿を70%エタノール

で洗浄して減圧乾燥した。この乾燥標品を再度、500μlのTE緩衝液に溶解し、オリゴdTセルロースカラム精製を繰り返して行った。得られたポリ(A)+RNAのうち、開花後、5日目の胚珠ポリ(A)+RNAについては、cDNAライブラリーと、ディファレンシャルスクリーニングに用いるcDNAプローブの作製に、開花後、25日目の胚珠についてはディファレンシャルスクリーニングに用いるcDNAプローブの作製に用いた。

【0052】(2) 繊維伸長期cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーの作製は、ZAP-cDNA Synthesis Kit(stratagene社製)を使用した。上記(1)で得られた開花後、5日目の胚珠のポリ(A)+RNAを鋳型として、オリゴ(dT)プライマーと逆転写酵素を用い、GublerとHoffmanらの方法(Gene, 25, 263-269(1983))に従い、2本鎖cDNAを合成した。得られたcDNAの両末端にEcoRIアダプター(内部にXhoIとSpeIサイトを持つ)を連結し、XhoIで消化した後、それを入フェージベクター、λZAPIIアームのEcoRIとXhoI部位に連結後、インビトロパッケージングキット(Stratagene社製、GIGAPACK Gold)を用い、パッケージングを行ない、大腸菌SURE株(OD₆₀₀=0.5)に感染させることにより多数の組換え入フェージを得た。これを繊維組織由来のcDNAライブラリーとした。このライブラリーのサイズは5.0×10⁶であった。

【0053】(3) プローブの作製

開花後、5日目の胚珠と開花後、25日目の胚珠からそれぞれ調製したポリ(A)+RNAを鋳型として、オリゴ(dT)プライマーと逆転写酵素、M-MLV(東洋紡社製)を用いて、cDNAを合成した。合成後、ポリ(A)+RNAを取り除くためにアルカリ加水分解処理を行ない、得られたcDNAを鋳型として、Random Primed DNA Labeling Kit(USB社製)を用いて、³²P標識プローブを作製した。得られた³²P標識cDNAをディファレンシャルスクリーニングのプローブに用いた。開花後、5日目のcDNAより調製したものを繊維伸長区プローブ、開花後、25日目の胚珠のcDNAより調製したものを繊維停止区プローブとしてディファレンシャルスクリーニングを行なった。

【0054】(4) 繊維形成および伸長に関与する遺伝子のスクリーニング

前記した伸長区由来のcDNAライブラリーを構成するフェージを大腸菌に感染させて、LB寒天培地上で増殖させ、約50,000個のフェージDNAをそれぞれ2枚のナイロンメンブレン(ハイボンド-N、アマシャム社製)に写し取った。フェージDNAを写し取ったナイロンメンブレンをアルカリ変性液(0.5M NaOH、1.5M NaCl)を含んだ濾紙に移し、4分間放置し、次に中和液(0.5M

Tris-HCl、1.5M NaCl、pH8.0)を含んだ濾紙上に移し、5分間放置した。2×SSC (0.3M NaCl、0.03M クエン酸 3-ナトリウム)で洗浄した後、メンブレンをストラタリンカー(Stratagene社製)を用い、DNAの固定を行なった。固定処理を行なったナイロンメンブレンをハイブリダイゼーション溶液[50%ホルムアミド、0.5% SDS、6×SSPE (3M NaCl、0.2M NaH_2PO_4 、20mM EDTA·2Na、pH7.4)、5×デンハルト溶液(0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ウシ血清アルブミン)、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNAを含有]中において、42℃で3時間プレハイブリさせ、上記(3)で作製したcDNAプローブ(繊維伸長区プローブ、繊維停止区プローブ)を加え、42℃で20時間ハイブリダイズさせた。その後、メンブレンを取り出し、2×SSC、1×SSC、0.5×SSC および0.1×SSC を含有する溶液を用いて、42℃で1時間～2時間洗浄した。このメンブレンを乾燥した後、X線フィルムを密着させて一晩感光させた。

【0055】その結果、繊維伸長区プローブで、繊維停止区プローブより強くハイブリダイズした陽性クローンを34個選抜することができた。そのうち、特に強くハイブリダイズしたKC18とKC22とKC03と命名したクローンについて解析を進めた。

【0056】3つのKC18、KC22とKC03のファージDNAから、インビボ・エクシジョン法により、cDNAインサートを持つプラスミドクローンを調製した。インビボ・エクシジョン法は、ZAP-cDNA Synthesis Kit(stratagene社製)の方法に従った。それぞれのクローンを含むファージ液、200 μl 、大腸菌XL1-B1ue懸濁液、200 μl 、ヘルパーファージR408懸濁液1 μl を混ぜ、37℃で15分間インキュベートした後、3mlの2×YT培地を加え、37℃で2時間振盪培養し、70℃で20分間処理し、遠心分離(4,000×g、10分間)して上清を回収した。得られた上清30 μl と大腸菌SULRE懸濁液30 μl を混ぜ、37℃で15分間インキュベートした後、アンピシリンを50ppm含むLB寒天培地に数 μl 植菌し、37℃で一晩培養した。コロニーを形成した大腸菌は、cDNAインサートを持つプラスミドクローンpKC18、pKC22、およびpKC03を含んでいた。

【0057】これらのプラスミドの挿入配列の塩基配列決定を、ダイデオキシ法(Messing, Methods in Enzymology, 101, 20-78(1983))により行なった。得られた塩基配列をそれぞれ配列番号1(クローンKC18)、3(クローンKC22)および5(クローンKC03)、およびこれらの配列から推定されるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号2、4および6に示す。これらの配列は、それぞれ繊維伸長期に繊維組織特異的に発現量が増加するcDNAの塩基配列、及びアミノ酸配列を示すものである。

【0058】なお、これらの遺伝子の塩基配列を既知遺伝子塩基配列のデータベースとホモロジーサーチを行うと、KC03はトマトのエクステンシン遺伝子とホモロジーがあり、KC22はアズキ、トマト等のキシログルカントランスフェラーゼ[西谷ら、J. Biol. Chem., 268, 25364-25368, (1993)]やアラビドプシスの頂端分裂組織に特異的に発現するmeri-5遺伝子[Medford, J. I., Elmer, J. S., and Klee, H. J., Plant Cell, 3, 359-370, (1991)]と部分的に相同性がある。KC18については既知遺伝子の塩基配列とホモロジーが見い出されなかった。

【0059】(5)ノーザンブロット解析

これらの遺伝子が繊維伸長期に繊維組織特異的に発現していることを確かめるために、ノーザンブロットングを下記に示すようにして行った。スービマ(G. barbadense)の種子、葉、シードリング、開花後、10日目の胚珠、14日目の繊維、14日目の繊維を取り除いた胚珠、22日目の繊維、22日目の繊維を取り除いた胚珠より、RNAを抽出した。RNA抽出方法は実施例1のようにして行った。得られた全RNA20 μg を1.5%ホルムアルデヒドアガロースゲルで電気泳動した後、ハイボンドNナイロンメンブレンに一晩ブロットングした。UVクロスリンカーでRNAを固定した後、プレハイブリダイゼーションバッファー(50%ホルムアミド、5×デンハルト、0.1%SDS、100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ サケ精子DNA、pH7.0)で、42℃、6時間プレハイブリダイゼーションを行った。KC18、KC22、KC03の全長cDNAを ^{32}P -dCTPとランダムラベルキット(アマシャム社製)を用いて、プローブを作製した。このプローブをプレハイブリダイゼーションに加え、42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、メンブレンを1×SSC、0.1%SDSを含む洗浄液で、60℃、30分2回洗浄した。メンブレンをX線フィルム(Kodak)を用いて、オートラジオグラフィーをとった。

【0060】KC18のノーザンブロットングの結果を図1に示す。このノーザンブロットングによりKC18遺伝子発現の組織と時期特異性が明らかにされた。レーン1は開花後、10日目の全胚珠、レーン2は成熟種子、レーン3は播種後、18日目のシードリング、レーン4は葉、レーン5は開花後、10日目の全胚珠、レーン6は開花後、14日目の繊維、レーン7は開花後、14日目の繊維を取り除いた胚珠、レーン8は開花後、22日目の繊維、レーン9は開花後、22日目の繊維を取り除いた胚珠を示す。KC18では、開花後、10日目の胚珠に特異的なシグナルが得られた。また、繊維伸長及び発達中の繊維(14日目の繊維)にもシグナルが得られた。しかし、葉や種子、シードリングにはほとんどシグナルが得られなかった。このことからKC18は、繊維伸長及び発達中の綿繊維において、強く発現するものと

考えられる。KC22のノザンブローティングの結果を図2に示す。このノザンブローティングによりKC22遺伝子発現の組織と時期特異性が明らかにされた。レーン1は開花後、10日目の全胚珠、レーン2は成熟種子、レーン3は播種後、18日目のシードリング、レーン4は葉、レーン5は開花後、10日目の全胚珠、レーン6は開花後、14日目の繊維、レーン7は開花後、14日目の繊維を取り除いた胚珠、レーン8は開花後、22日目の繊維、レーン9は開花後、22日目の繊維を取り除いた胚珠を示す。KC22では、開花後、10日目の胚珠に強いシグナルが得られ、開花後、14日目の繊維、繊維を取り除いた胚珠 (stripped ovule)、開花後、22日目の繊維にシグナルが得られた。実生苗では、わずかにシグナルが得られたが種子、葉ではシグナルが得られなかった。このことからKC22は繊維伸長及び発達中の繊維や特に開花後、10日目の胚珠で強く発現していると考えられる。KC03のノザンブローティング結果を図3に示す。このノザンブローティングによりKC03遺伝子発現の組織と時期特異性が明らかにされた。レーン1は開花後、10日目の全胚珠、レーン2は成熟種子、レーン3は播種後、18日目のシードリング、レーン4は葉、レーン5は開花後、10日目の全胚珠、レーン6は開花後、14日目の繊維、レーン7は開花後、14日目の繊維を取り除いた胚珠、レーン8は開花後、22日目の繊維、レーン9は開花後、22日目の繊維を取り除いた胚珠を示す。KC03では、開花後、10日目の胚珠で強いシグナルが得られた。

【0061】(6) 大腸菌による目的遺伝子の発現
KC18を含む形質転換体を $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むLB培地 50ml に懸濁し、 37°C で振盪培養した。培養液の濁度が $\text{OD}_{660}=0.2$ となったところで、終濃度 10mM となるようにイソプロピルーβ-D-チオガラクトピレノシド (IPTG) を加え、IPTG添加後、 37°C で、濁度が $\text{OD}_{660}=1.0$ まで振盪培養した。培養終了後、 $1,600\times\text{g}$ 、15分間遠心分離し、菌体を回収した。回収した菌体を4倍量のLysis buffer [50mM Tris-HCl ($\text{pH}8.0$)、 1mM EDTA·2Na、 $1\mu\text{M}$ PMSF (フェニルメチルスフオニルフルオリド)、 10% ショ糖] に懸濁し、さらにリゾチーム (シグマ社製) を終濃度 $1\text{mg}/\text{ml}$ となるようにを加え、10分間氷上に静置した。10分後、非イオン界面活性剤、Nonidet P-40 (シグマ社製) を終濃度 1% になるように加え、さらに10分間氷上に静置し、その後、 $48,000\times\text{g}$ で1時間遠心した。得られた上清に等量の $2\times\text{Laemli sample buffer}$ [0.125M Tris-HCl ($\text{pH}6.8$)、 20% グルセロール、 $10\%\beta$ -メルカプトエタノール、 6% SDS、 0.1% ブロモフェノール・ブルー] を加え、2分間 boil した後、SDS-ポリアクリルア

ミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。泳動終了後、ゲルをクマシーブリリアンブルー (CBB) により染色し、 7% 酢酸、 25% メタノール液にて脱色を行った。目的とする分子量 41kDa 付近にバンドが見られ、目的遺伝子の発現を確認した。

【0062】(7) シロイヌナズナの形質転換体の作製
(1) プラスミドの構築

配列番号1に記載したKC18の塩基配列よりオープンリーディングフレームを全て含むように、Pst I と Hind III で切断し平滑末端化した。この断片を、平滑末端化した 35S プロモーターが連結しているバイナリーベクターpBI101-Hm2にサブクローニングした。このプラスミドをpBI35S-18と命名した。なお、形質転換された大腸菌JM109を、Escherichia coli JM109/pBI35S-18と命名した。

【0063】(2) プラスミドのアグロバクテリウムへの導入

(7)-(1) で得られた大腸菌pBI35S-18 (+) とヘルパープラスミドpRK2013をもつ大腸菌HB101を、それぞれ $50\text{mg}/\text{l}$ のカナマイシンを含むLB培地で 37°C で1晩、アグロバクテリウムEHA101株を $50\text{mg}/\text{l}$ のカナマイシンを含むLB培地で 37°C で2晩培養した。各培養液 1.5ml をエッペンドルフチューブに取り、集菌したのち、LB培地で洗浄した。これらの菌体を 1ml のLB培地に懸濁後、3種の菌を $100\mu\text{l}$ ずつ混合し、LB培地寒天培地にまき、 28°C で培養してプラスミドをアグロバクテリウムに接合伝達させた。1から2日後に一部を白金耳でかきとり、 $50\text{mg}/\text{l}$ カナマイシン、 $20\text{mg}/\text{l}$ ハイグロマイシン、 $25\text{mg}/\text{l}$ クロラムフェニコールを含むLB寒天培地上に塗布した。 28°C で2日間培養した後、単一コロニーを選択した。得られた形質転換体をEHA101/pBI35S-18と命名した。

【0064】(3) 無菌シロイヌナズナの栽培

シロイヌナズナWassilewskij a株 (以下、WS株と称す) の種子 (大阪大学、新名倬彦博士より提供) 数10粒を 1.5ml チューブに入れ、 70% エタノール 1ml を加え3分間放置した。続いて滅菌後 (5% 次亜塩素酸ナトリウム、 0.02% Triton X-100) に3分間浸し、滅菌水で5回洗浄した後に、MSOプレート (ムラシゲースクーク無機塩類 4.6g 、ショ糖 10g 、 $1000\times$ ビタミンストック液 1ml /リットル、 $\text{pH}6.2$) に置床した。このプレートを 4°C に2日間放置して低温処理を行い、続いて植物インキュベーター (サンヨー製、MLR-350HT) 中に 22°C 、光強度 6000ルクス 、長日条件下 (明期16時間、暗期8時間) にて、10日間培養した。

【0065】(4) アグロバクテリウムの感染

前記(3) で10日間培養したWS株の根を数株ずつそろ

えて、メスで1.5～2.0cm程度に切りそろえ、CIMプレート(MSOプレートに2,4-ジクロロフェノキシ酢酸を終濃度0.5 μ g/ml、カイネチンを0.05 μ g/mlとなりように加えたもの)に置き並べた。光強度3000ルクス、16時間明期、8時間暗期で2日間培養し、MS希釈液(ムラシゲススクグ無機塩類6.4g/l、pH6.3)で3倍に希釈したものをそれぞれ1mlずつチューブに分注し、この中にカルス化した根の切片を10分間浸した。2枚重ねた滅菌ろ紙上に並べ、余分な水分を除き、新しいCIMプレートに各々置き並べた。同条件にて2日間共存培養した。

【0066】(5) 除菌

各々の菌株が肉眼で観察できるまで十分に増殖した切片を除菌液(MS希釈液にクラフォランを終濃度200 μ g/mlになるように加えたもの)に移し、ゆっくり振盪させて60分間洗浄した。この操作を5回繰り返した後、滅菌ろ紙上で水分を取り除き、SIMCプレート(MSOプレートに、 N^6 -[2-イソペンテニル]アデニンを終濃度5 μ g/ml、IAAを終濃度0.15 μ g/ml、クラフォランを終濃度500 μ g/mlとなるように加えたもの)に置き並べ、光強度6000ルクス、16時間明期、8時間暗期で2日間培養した。

【0067】(6) 形質転換植物の選択

前記(5)で2日間培養した切片をSIMCSプレート(SIMCプレートにハイグロマイシンBを終濃度4.6U/mlとなるように加えたもの)に移植し、光強度6000ルクス、16時間明期、8時間暗期で培養した。以後、1週間毎に新しいSIMCSプレートに移植した。形質転換した切片は増殖を続け、ドーム状に盛り上がったカルスとなるが、非形質転換体は褐変した。形質転換体は約2週間後、カルスが緑色を呈し、約1ヵ月後、シュートが形成された。

【0068】(7) 形質転換植物の再生

シュートとなった植物体の根本を、カルス部分を含まないように剃刀もしくはメスで切り取り、RIMプレートに軽く乗せるように挿入した。8～10日後、1～2cm程度の根が数本形成したものをピンセットで無機塩類培地〔5mM KNO₃、2.5mM K-リン酸緩衝液(pH5.5)、2mM MgSO₄、2mM Ca(NO₃)₂、50 μ M Fe-EDTA、1000 \times 微量要素(70mM H₃BO₃、14mM MnCl₂、0.5mM CuSO₄、1mM ZnSO₄、0.2mM NaMoO₄、10mM NaCl、0.01mM CoCl₂)1ml/リットル〕に浸したロックウールミニポット(日東紡績社製)に定植し、培養した。開花し、さや形成後は、バーライトとバーライト(TES社製)を1:1に混合し、無機塩類混合培地に浸した土に植え換えた。約1ヵ月後、1株につき数百株の種子が得られた。これを以後、T1種子と称す。

【0069】(8) 抗生物質耐性株の選抜

T1種子約100粒を上記(3)と同様な方法で滅菌し、MSHプレートに播種した。ほぼ3:1の割合でバイグロマイシンB耐性株が発芽した。

【0070】(9) DNA抽出とサザンハイブリダイゼーション

前記(8)で発芽したT1種子を無機塩類培地に浸したロックウールミニポットにピンセットで移植し、光強度6000ルクス、16時間明期、8時間暗期、22℃の条件下で培養した。2週間後、ロックウールの表面をナイフで撫でるようにメスで地上部を切り取り、直ちに液体窒素で凍結した。これを液体窒素存在下に乳鉢で細かく粉碎し、1g当たり、3mlのDNA抽出用緩衝液〔200mM Tris-HCl(pH8.0)、100mM EDTA-2Na、1% N-ラウロイルサルコシナトリウム、100 μ g/ml プロテナーゼK〕を加え、十分攪拌した。60℃、1時間インキュベート後、遠心(10,000 \times g、10分間)し、上清をミクロスで濾過し、新しいチューブに移した。フェノール:クロロフォルム:イソアミルアルコール(25:24:1)抽出を3回行った後、エタノール沈殿を行った。沈殿をTE緩衝液に溶解した。それぞれ植物体約2.0gから、20 μ gずつのゲノムDNAを得られた。このうち1 μ gのDNAを用いて、それぞれを制限酵素EcoRI、HindIIIで切断し、1%アガロース電気泳動およびサザンハイブリダイゼーションに供した。

【0071】また、形質転換を行っていないWS株の種子を発芽、生育させ、植物体より、同様にDNAを抽出し、制限酵素PstIによる消化を行い、1%アガロースゲル電気泳動及びサザンハイブリダイゼーションに供した。ハイブリダイゼーション用プローブはpKC18を用いた。

【0072】サザンハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)、第9章、第31～58頁〔コールド・スプリング・ハーバー社、1989年刊〕に記載の方法に従って行った。すなわち、それぞれのDNA試料について1%アガロースゲル電気泳動を行い、泳動後、アルカリ変性を行い、ナイロンメンブレン(ハイボンダーN、アマーシャム社製)に一晩サザンブロットした。紫外線トランスイルミネーター(254nm)に3分間照射させ、DNAを固定した。このメンブレンをプレハイブリダイゼーション緩衝液(5 \times デンハルト液、6 \times SSC、0.1% SDS、10 μ g/ml サケ精子DNA)5ml中で50℃、2時間プレハイブリダイゼーションを行った。次いでプローブを加え、50℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの後、メンブレンを2 \times SSC、0.1% SDSを含む洗浄液で室温10分間2回洗浄し、続いて同じ洗浄液で50℃、30分間で2回洗浄した。メ

ンブレンは乾燥させた後、X線フィルム（コダック社製）を入れたカセット内で -80°C 、一晚感光させ、オートラジオグラフィーをとった。形質転換を行っていない株（i）、pKC18を導入した形質転換体（ii）、ベクターのみを導入した形質転換体（iii）について、サザンハイブリダイゼーションにより検出されたシグナルのパターンを比較した。

【0073】形質転換体（ii）から得た特定のシグナルは、（i）、（ii）、（iii）に共通した内在性シグナルのほかに、Pst Iで切断したサンプルの約1.6および0.7 kbpの位置およびHindIIIで切断したサンプルの約3.0 kbpの位置に特異的なシグナルが観察され、目的遺伝子が（ii）に組み込まれていることが観察された。

【0074】**実施例2** RT-PCR産物のディファレンシャルディスプレイ法による遺伝子取得

（1）ポリ（A）⁺RNAの調製

圃場に栽培しているコーカー312（*Gossypium hirsutum* L.）を供試材料に用いた。開花後、8日目の胚珠より繊維と繊維を剥いた胚珠から全RNAを実施例1に示した方法に従ってそれぞれ調製した。

（2）DNase処理

30～50 μg の全RNAを1.5 mlのマイクロチューブに移し、40 μl のDNase反応緩衝液、5 μl のRNase阻害剤、10 μl のDNase Iを加え、ジエチルピロカーボネート処理した水を用い、100 μl に調製した。37 $^{\circ}\text{C}$ で30分間インキュベートし、フェノール抽出法で、全RNAを精製した。精製した全RNAに0.5倍量の7.5 M酢酸アンモニウム、2倍量のエタノールを添加してよく混合し、 -20°C で一時間静置した。その後、10,000 $\times g$ で15分間遠心分離し、得られた沈殿を70%エタノールで洗浄して減圧乾燥した。

【0075】（3）ファーストストランドcDNAの合成

DNase処理した2 μg の全RNAを0.5 mlのマイクロチューブに移し、ジエチルピロカーボネート処理した水を用いて、25 μl に調製した。65 $^{\circ}\text{C}$ 、10分間の熱処理後、氷上で急冷した。3'末端に2塩基M及びN（M=A,C,G; N=A,C,G,T）を延長付加したオリゴ（dT）プライマーと逆転写酵素M-MLV（東洋紡社製）を用いて、ファーストストランドcDNAを合成した。

【0076】（4）PCRによる増幅

得られたファーストストランドcDNAをcDNA合成に用いたオリゴ（dT）プライマーとランダムデカマープライマーを用いてPCR反応を行った。PCR反応のステップは、94 $^{\circ}\text{C}$ 、30秒、42 $^{\circ}\text{C}$ 、1分間、72 $^{\circ}\text{C}$ 、30秒で40サイクル行ない、最後に72 $^{\circ}\text{C}$ 、5分間反応した。

【0077】（5）DNAシークエンスゲル電気泳動 PCR増幅産物を6%非変性ポリアクリルアミドシーク

エンスゲル電気泳動を行い、泳動後、ゲルを乾燥させた後、X線フィルム（コダック社製）を入れたカセット内で、 -80°C 、10時間感光させオートラジオグラフィーをとった。この結果を図4に示す。左側4つのレーンには ^{35}S 標識サンプル、および右側4つのレーンには ^{32}P 標識サンプルを示す。この写真では3つの矢印が繊維特異的バンドを示す。

【0078】（6）特異的PCR産物の確認と回収 繊維組織のみに検出される20本の目的バンドを確認し、カミソリの刃を用いてゲルから切り出した。切り出したゲルを1.5 mlのマイクロチューブに移し、300 μl の水を添加し、10分間煮沸し、ゲルからDNA断片を溶出した。回収した20個のDNA断片をTAクローニングベクター（invitrogen社製）にサブクローニングし、大腸菌に形質転換後、常法に従ってプラスミドDNAを調製した。塩基配列についてはダイデオキシ法（Messing, Methods in Enzymol., 101, 20-78 (1983))により行った。5'側にATGのスタートコドンを含まないクローンについては、繊維組織由来のcDNAライブラリーからPCR法でスクリーニングした。

【0079】（7）ノーザンブロット解析

ワタ植物コーカー312（*G. hirsutum*）を供試材料に用いて、実施例1の5章と同様な方法でディファレンシャルディスプレイで得られた2つのクローン（Gh2, Gh3）をプローブにして、組織と繊維発達時期についてノーザンハイブリダイゼーション解析を行った。この結果を図5、図6、図7及び図8に示す。その結果、Gh2は開花後、8日目の繊維と胚珠（intact ovule）で強くハイブリダイズした（図5）。さらに、Gh2が繊維の成長の過程でどの時期に発現しているかを調べたところ、繊維伸長及び発達時期である開花後、6日、8日、10日、12日および15日目の繊維で強くハイブリダイズした（図6）。すなわち、Gh2はワタ繊維伸長及び発達時期に繊維組織で多く発現していることが明らかとなった。

【0080】一方、Gh3は花卉（Petal）でわずかにハイブリダイズしているが、開花後、8日目の繊維と胚珠（intact ovule）で強くハイブリダイズした（図7）。さらに、Gh3の時期特異性について調べたところ、繊維伸長及び発達時期である開花後、6日、8日、10日目の繊維で強くハイブリダイズした（図8）。すなわち、Gh3はワタ繊維伸長及び発達時期に繊維組織で多く発現していることが明らかとなった。

【0081】（8）既知遺伝子とのホモロジー検索 Gh2, Gh3遺伝子について既知遺伝子塩基配列のデータベースとホモロジー検索を行った。Gh2は、ACP（Acyl Carrier Protein）と高い相同性を示した。アミノ酸配列による比較を行ったところ、他の既知の植物ACPと58～69%の類似性を示した（表1）。セリン残基と知られている補欠分子族との結合部位の周囲にあ

る高度に保存されている12個のアミノ酸は、すべての植物ACPにあるものと一致した。このワタACPは単子葉植物(monocotyledonous)と双子葉(dicotyledonous)植物の塩基配列と同程度の類似性がある。植物ACPの前駆体は、トランスペプチドと成熟ACPタンパクの間に開裂部位を含み、この部位の回りの配列は保存されている。Gh2はワタ繊維特異的ACPであると考えられる。このワタ繊維特異的ACP cDNAは、CC▼AAK (▼=開裂部位)をもち、大麦ACPIIIとよく似ている。胚珠の表皮細胞は開花後伸長を開始する。繊維は開花直後から開花後、25日まで伸長し、次に二次細胞壁厚化を促し最後に成熟する。成熟したワタ繊維は最終径20から40 μ m、長さ20mmから40mmの単一細胞である。この伸長は1000~3000倍の長さの増加であり、この間にGh2遺伝子は強く発現し繊維の伸長に関与していると考えられる。特にGh2の発現は組織特異的に制御され繊維伸長期間に必要な脂質合成の高い要求に応えるため繊維伸長時に特異的に発現している遺伝子と考えられる。Gh3については既知遺伝子の配列と相同性が見いだされなかった。

【0082】

【表1】

ワタ繊維ACPと他の植物ACPの比較			
植 物	起 源	DNA ホモロジー(%)	アミノ酸 ホモロジー(%)
オオムギACP	葉	65	67
シヨイヌズナACP1	葉	66	61
ホウレンソウACP-1	葉	66	59
トウモロコシ	葉	65	59
Cuphea lanceolata	胚	69	61
Brassica napus (アブラナ)	胚	69	58

【0083】実施例3 ワタ繊維形成に関与する遺伝子のクローニング

1. ポリ(A)+RNAの調製

圃場に栽培しているスービマ(G. barbadense)を供試材料に用いた。開花後5日目から15日目の胚珠と開花後、25日目から30日目の胚珠を採取し、種子から繊維を分離した。得られたワタ繊維約5gを直ちに液体窒素中で凍結し、液体窒素存在下乳鉢で細かく粉砕した。その後、10mlの抽出用0.2Mトリス酢酸緩衝液〔5Mグアニジンチオシアネート、0.7% β -メルカプトメタノール、1%ポリビニルピロリドン(M.W.360,000)、0.62%N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム含有、pH8.5)を加え、ポリトロンホモジナイザー(KINEMATICA社製)を用い、氷冷下2分間粉砕した。ただし、 β -メルカプトエタノールとポリビニルピロリドンは使用する直前に添加した。その後、粉砕液を17,000 \times gで20分間遠心分離し、上清を回収した。

【0084】この上清をミラクロスに汙濁し、その汙液を遠心管に入れた5.7M塩化セシウム溶液1.5mlに静かに重層し、155,000 \times g、20℃で20時間

遠心した後、上清を捨てRNAの沈殿を回収した。この沈殿を3mlの10mM Tris-HCl、1mM EDTA \cdot 2Na、pH8.0(TE緩衝液と呼ぶ)に溶解し、さらに等量のフェノール：クロロホルム：イソamilアルコール(容積比、25:24:1)を加え良く混合した後、遠心分離を行って上層の水層を回収した。得られた水層に、1/10倍量の3M酢酸ナトリウム(氷酢酸でpH6.2に調製)と、2.5倍量のエタノールを添加して良く混合し、-20℃で一晩静置した。その後、17,000 \times gで20分間遠心分離し、得られた沈殿を70%エタノールで洗浄して減圧乾燥した。

【0085】この乾燥標品を500 μ lの前述のTE緩衝液に溶解し、全RNA溶液を得た。このRNA溶液を65℃で5分間インキュベートした後、氷上で急冷した。これに2 \times 結合緩衝液(10mM Tris-HCl、5mM EDTA \cdot 2Na、1M NaCl、0.5% SDS、pH7.5)を等量になるようにRNA溶液に加え、平衡化緩衝液(10mM Tris-HCl、5mM EDTA \cdot 2Na、0.5M NaCl、0.5% SDS、pH7.5)で予め平衡化したオリゴdTセルロースカラム(クロンテック社製)に重層した。次いで、カラムを約10倍量の前述の平衡化緩衝液で洗浄した後、溶出緩衝液(10mM Tris-HCl、5mM EDTA \cdot 2Na、pH7.5)でpoly(A)+RNAを溶出した。

【0086】得られた溶出液に、1/10倍量の前述の3M酢酸ナトリウム水溶液と2.5倍量のエタノールを加え混合し、-70℃で静置した。その後、10,000 \times gで遠心分離を行ない、得られた沈殿を70%エタノールで洗浄して減圧乾燥した。この乾燥標品を再度500 μ lのTE緩衝液に溶解し、オリゴdTセルロースカラム精製を繰り返した。繊維伸長期のワタ繊維から得られたpoly(A)+RNAについては、cDNAライブラリーと、ディファレンシャル・スクリーニングに用いるcDNAプローブの作製に、繊維伸長停止期のワタ繊維から得られたpoly(A)+RNAについてはディファレンシャル・スクリーニングに用いるcDNAプローブの作製に用いた。

【0087】2. 繊維伸長期特異的cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーの作製はZAP-cDNA Synthesis Kit(Stratagene社製)を使用した。1.で繊維伸長期のワタ繊維から得られたpoly(A)+RNAを鋳型としてオリゴ(dT)プライマーと逆転写酵素を用い、GublerとHoffmanらの方法〔Gene,25,263-269(1983)〕に従い2本鎖cDNAを合成した。得られたcDNAの両末端にEcoRIアダプター(内部にXhoIとSpeIサイトを持つ)を連結し、XhoIで消化した後、それを λ ファージベクター、 λ ZAPIIアームのEcoRIとXhoI部位

に連結後、インビトロ パッケージングキット (Stratagene社製、GIGAPACK Gold) を用い、パッケージングを行ない、大腸菌SURE株 ($OD_{660}=0.5$) に感染させることにより多数の組換え入ファージを得た。これを繊維伸長期に特異的なcDNAライブラリーとした。このライブラリーのサイズは 5.0×10^6 であった。

【0088】3. プロブの作製

繊維伸長期と繊維伸長停止期のワタ繊維から、それぞれ調製したpoly (A)+RNAを鋳型として、オリゴ (dT) プライマーと逆転写酵素M-MLV (東洋紡社製) を用いてcDNAを合成した。合成後、poly (A)+RNAを取り除くためにアルカリ加水分解処理を行ない、得られたcDNAを鋳型として、Random Primed DNA Labeling Kit (USB社製) を用いて、 32 P標識プロブを作製した。繊維伸長期のワタ繊維から得られたcDNAと繊維伸長停止期のワタ繊維から得られたcDNAより調製した 32 P標識プロブをそれぞれポジティブプロブとネガティブプロブとしてディファレンシャル・スクリーニングに用いた。

【0089】4. 繊維形成及び伸長に関する遺伝子のスクリーニング

前記した、繊維伸長期のワタ繊維由来のcDNAライブラリーを構成するファージを大腸菌に感染させてLB寒天培地上で増殖させ、約50,000個のファージDNAをそれぞれ2枚のナイロンメンブレン (ハイボンダーン、アマシャム社製) に写し取った。

【0090】ファージDNAを写し取ったナイロンメンブレンをアルカリ変性液 (0.5M NaOH、1.5M NaCl) を含んだ濾紙上に移し、4分間放置し、次に中和液 (0.5M Tris-HCl、1.5M NaCl、pH8.0) を含んだ濾紙上に移し5分間放置した。2×SSC (0.3M NaCl、0.03M クエン酸三ナトリウム) で洗浄した後、メンブレンをストラタリンカー (Stratagene社製) を用い、DNAの固定を行なった。固定処理を行なったナイロンメンブレンをハイブリダイゼーション溶液 [50%ホルムアミド、0.5% SDS、6×SSPE (3M NaCl、0.2M NaH_2PO_4 、20mM EDTA・2Na、pH7.4)、5×デンハルト溶液 (0.1%フィコール、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ウシ血清アルブミン)、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNAを含む] 中において、42℃で3時間アレハイブリさせ、上記3. で作製したcDNAプロブを加え、42℃で20時間ハイブリダイズさせた。その後、メンブレンを取り出し、2×SSC、1×SSC、0.5×SSCおよび0.1% SSCを含有する溶液を用いて、42℃で1時間～2時間洗浄した。このメンブレンを乾燥した後、X線フィルムを密着させて一晩感光させた。

【0091】その結果、ポジティブプロブ (繊維伸長期) でより強くハイブリダイズした陽性クローンを34

個選抜することができた。そのうち、KC22と命名したクローンについて解析を進めた。KC22は既に報告のある、ダイズのブラシノステロイドによって発現が誘導される遺伝子 [D.M.Zurek and S.D.Clouse, Plant Physiol (ROCKV) 102, 132, (1993)]、アズキ、トマト等のキシログルカントランスフェラーゼ [西谷ら, J.Biol.Chem. 268, 25364-25368, (1993)] やアラビドプシスの頂端分裂組織に特異的に発現するmeri-5遺伝子 [Medford, J.I., Elmer, J.S., and Klee, H.J., Plant Cell, 3, 359-370, (1991)] と部分的に相同性がある。

【0092】さらに、KC22についてブラシノリド処理区と対照区、(器官) でのノーザン解析を行なった。ブラシノリドを含む培地で7日間胚珠培養 (in vitro) を行ない、得られた繊維と、ブラシノリドを含まない培地で同様な培養 (in vitro) を行って得られた繊維、さらに開花後、7日目のインタクトな胚珠 (in vivo) から、それぞれRNAを抽出し、KC22の発現量を調べた。ノーザン分析の結果を図9に示す。この分析の結果、ブラシノリドによるKC22の特異的遺伝子発現が明らかにされた。レーン1はコーカー312 (Gossypium hirsutum) (開花後、7日のintact 胚珠から得た：比較例) から得た in vivo繊維RNA、 10^{-8} Mブラシノリドによるin vitro繊維RNA (7日間培養した胚珠から得た：本発明) およびレーン3は in vitro 繊維RNAコントロール (7日間培養した胚珠から得た：比較例) を示す。KC22は1 μM ブラシノリドを含む培地で胚珠培養した繊維で強く発現した。このことはKC22がブラシノリドによって発現が調節されていることを明らかにしている。

【0093】KC22のファージDNAから、インビボ・エクシジョン法によりcDNAインサートを持つプラスミドクローンpKC22を調製した。インビボ・エクシジョン法は、Zap-cDNA Synthesis Kit (Stratagene社製) の方法に従った。KC22を含むファージ液200 μl 、大腸菌XL1-B1ue懸濁液200 μl 、ヘルパーファージR408懸濁液1 μl を混ぜ37℃で15分間インキュベートした後、3mlの2×YT培地を加え37℃で2時間振盪培養し、70℃で20分間処理し、遠心分離 (4,000×g、10分間) して上清を回収した。得られた上清30 μl と大腸菌SOLR懸濁液30 μl を混ぜ、37℃で15分間インキュベートした後、アンピシリンを50ppm含むLB寒天培地に数 μl 植菌し、37℃で一晩培養した。コロニーを形成した大腸菌は、cDNAインサートを持つプラスミドクローンpKC22を含んでいる。

【0094】このプラスミドpKC22中の挿入配列の塩基配列決定を、ダイデオキシ法 [Messing, Methods in Enzymol., 101, 20-78 (1983)] により行なった。得られた塩基配列を配列番号3、及びこの配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号4に示す。これらの配列は、

ブラシノライド処理による、繊維形成時に発現量が増加するcDNAの塩基配列、及びアミノ酸配列を示すものである。

【0095】5. 大腸菌による目的遺伝子の発現
KC22を含む形質転換体を100 μ g/mlのアmpiシリンを含むLB培地50mlに懸濁し、37℃で振盪培養した。培養液の濁度がOD₆₆₀=0.2となったところで、終濃度10mMとなるようにイソプロピル- β -D-チオガラクトピレノシド(IPTG)を加え、IPTG添加後、37℃で、濁度がOD₆₆₀=1.0まで振盪培養した。培養終了後、1,600 \times g、15分間遠心し菌体を回収した。回収した菌体を4倍量のLysis buffer〔50mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA \cdot 2Na、1 μ M PMSF(フェニルメチルスルフォニルフルオリド)、10% Sucrose〕に懸濁し、さらに、Lysozyme(シグマ社製)を終濃度1mg/mlになるように加え、10分間氷上に静置した。10分後、Nonidet P-40(シグマ社製)を終濃度1%になるように加え、さらに10分間氷上に静置し、その後、48,000 \times gで1時間遠心した。得られた上清に等量の2 \times Laemli sample buffer〔0.125M Tris-HCl(pH6.8)、20% glycerol、10% β -mercaptoethanol、6% SDS、0.1% Bromophenol Blue〕を加え、2分間 boil した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行なった。泳動終了後、ゲルをクマシーブリリアントブルー(CBB)により染色し、7%酢酸、25%メタノール液にて脱色を行なった。目的とする分子量39kDa付近にバンドが見られ、目的遺伝子の発現を確認した。

【0096】6. シロイヌナズナの形質転換体の作製
(1) プラスミドの構築
配列番号3に示したKC22の塩基配列よりオープンリーディングフレームをすべて含むように、DraIで切断した。このDraI断片をpUC19のSmaIサイトにサブクローニングした。このプラスミドをSalI、HindIIIで切断し、35SプロモーターのHindIII、XhoI断片をサブクローニングした。つぎにこのクローンをHindIII、SacIで切断し、バイナリーベクターpBI101-Hm2のHindIIIからSacIまでの間にサブクローニングした。このプラスミドをpBI35S-22(+)と命名した。なお、形質転換された大腸菌JM109を、Escherichia coli JM109/pBI35S-22(+)と命名した。同様にアンチセンス方向のプラスミドも作成し、該プラスミドをpBI35S-22(-)、これを含む大腸菌をE. coli JM109/pBO35S22(-)と命名した。

【0097】(2) プラスミドのアグロバクテリウムへの導入

6-(1)で得られた大腸菌pBI35S-22(+)とヘルパープラスミドpRK2013を持つ大腸菌HB101株を、それぞれ50mg/lのカナマイシンを含むLB培地で37℃で1晩、アグロバクテリウムEHA101株を50mg/lのカナマイシンを含むLB培地で37℃で2晩培養した。各培養液1.5mlをエッペンドルフチューブに取り集菌したのち、LB培地で洗浄した。これらの菌体を1mlのLB培地に懸濁後、3種の菌を100 μ lずつ混合し、LB培地寒天培地にまき、28℃で培養してプラスミドをアグロバクテリウムに接合伝達させた。1~2日後に一部を白金耳でかきとり、50mg/lカナマイシン、20mg/lハイグロマイシン、25mg/lクロラムフェニコールを含むLB寒天培地上に塗布した。28℃で2日間培養した後、単一コロニーを選択した。得られた形質転換体をEHA101/pBI35S-22(+)と命名した。アンチセンスをEHA101/pBI35S-22(-)と命名した。

【0098】(3) 無菌シロイヌナズナの栽培
シロイヌナズナWassilewskij株(以下WS株と称す)の種子(大阪大学、新名博彦博士より提供)数10粒を1.5mlチューブに入れ、70%エタノール1mlを加え3分間放置した。続いて滅菌液(5%次亜塩素酸ナトリウム、0.02% Triton X-100)に3分間浸し、滅菌水で5回洗浄した後に、MSOプレート(ムラシゲースクーク無機塩類4.6g、ショ糖10g、1000 \times ビタミンストック液1ml/リットル、pH6.2)に置床した。このプレートを4℃に2日間放置して低温処理を行い、続いて植物インキュベーター(サンヨー製、MLR-350HT)中に22℃、光強度6000ルクス、長日条件下(明期16時間、暗期8時間)にて、10日間培養した。

【0099】(4) アグロバクテリウムの感染
前記で10日間培養したWS株の根を数株ずつそろえて、メスで1.5~2.0cm程度に切りそろえ、CIMプレート(MSOプレートに2,4-ジクロロフェノキシ酢酸を終濃度0.5 μ g/ml、カイネチンを0.05 μ g/mlとなるように加えたもの)に置き並べた。光強度3000ルクス、16時間明期、8時間暗期で2日間培養し、MS希釈液(ムラシゲースクーク無機塩類6.4g/l、pH6.3)で3倍に希釈したものをそれぞれ1mlずつチューブに分注し、この中にカルス化した根の切片を10分間浸した。2枚重ねた滅菌ろ紙上に並べ、余分な水分を除き、新しいCIMプレートに各々置き並べた。同条件にて2日間共存培養した。

【0100】(5) 除菌
各々の菌株が肉眼で観察できるまで十分に増殖した切片を除菌液(MS希釈液にクラフォランを終濃度200 μ g/mlになるように加えたもの)に移し、ゆっくり振盪させて60分間洗浄した。この操作を5回繰り返した。

後、滅菌ろ紙上で水分を取り除き、SIMCプレート（MSOプレートに、2-*ip*を終濃度5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、IAAを終濃度0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、クラフォランを終濃度500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加えたもの）に置き並べ、光強度6000ルクス、16時間明期、8時間暗期で2日間培養した。

【0101】(6) 形質転換植物の選択

前記で2日間培養した切片をSIMCSプレート（SIMCプレートにハイグロマイシンBを終濃度4.6 U/mlとなるように加えたもの）に移植し、光強度6000ルクス、16時間明期、8時間暗期で培養した。以後、1週間毎に新しいSIMCSプレートに移植した。形質転換した切片は増殖を続け、ドーム状に盛り上がったカルスとなるが、非形質転換体は褐変した。形質転換体は約2週間後、カルスが緑色を呈し、約1カ月後、シュートが形成された。

【0102】(7) 形質転換植物の再生

シュートとなった植物体の根本を、カルス部分を含まないように剃刃もしくはメスで切り取り、RIMプレートに軽く乗せるように挿した。8~10日後、1~2 cm程度の根が数本形成したものをピンセットで無機塩類培地〔5 mM KNO_3 、2.5 mM K -リン酸緩衝液（pH 5.5）、2 mM MgSO_4 、2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、50 μM Fe-EDTA 、1000 \times 微量要素（70 mM H_3BO_3 、14 mM MnCl_2 、0.5 mM CuSO_4 、1 mM ZnSO_4 、0.2 mM NaMoO_4 、10 mM NaCl 、0.01 mM CoCl_2 ）1 ml/リットル〕に浸したロックウールミニポット（日東紡績社製）に定植し、培養した。開花し、さや形成後は、バーライトとバーキュライト（TES社製）を1:1に混合し無機塩類混合培地に浸した土に植え替えた。約1カ月後、1株につき数百粒の種子が得られた。これを以後、T1種子と称す。

【0103】(8) 抗生物質耐性株の選択

T1種子約100粒を(3)と同様の方法で滅菌し、M_{SH}プレートに播種した。ほぼ3:1の割合でハイグロマイシンB耐性株が発芽した。

【0104】7. DNA抽出とサザンハイブリダイゼーション

前記で発芽したT1種子を、無機塩類培地に浸したロックウールミニポットにピンセットで移植し、光強度6000ルクス、16時間明期、8時間暗期、22℃の条件下で培養した。2週間後、ロックウールの表面をナイフで撫でるようにメスで地上部を切り取り、直ちに液体窒素で凍結した。これを液体窒素存在下、乳鉢で細かく粉碎し、1 g当たり、3 mlのDNA抽出用緩衝液〔200 mM Tris-HCl （pH 8.0）、100 mM EDTA-2Na 、1% N -ラウロイルサルコシナトリウム、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinase K 〕を加え十分攪拌した。60℃1時間インキュベート後、遠心（1

0,000 \times g、10分間）し、上清をミラクロスで濾過し、新しいチューブに移した。フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25:24:1）抽出を3回行った後、エタノール沈殿を行った。沈殿をTE緩衝液に溶解した。それぞれ植物体約2.0 gから、20 μg ずつのゲノムDNAが得られた。このうち1 μg のDNAを用いて、それぞれを制限酵素EcoRI、HindIIIで切断し、1%アガロース電気泳動及びサザンハイブリダイゼーションに供した。

【0105】また、形質転換を行っていないWS株の種子を発芽、生育させ、植物体より、同様にDNAを抽出し、制限酵素EcoRI、HindIIIによる消化を行ない、1%アガロースゲル電気泳動及びサザンハイブリダイゼーションに供した。ハイブリダイゼーション用プローブはpKC22を用いた。サザンハイブリダイゼーションは、モレキュラー クローニング、ア ラボラトリー マニュアル（Molecular Cloning, A Laboratory Manual）、第9章、第31~58頁〔コールド スプリング ハーバー（Cold Spring Harbor）社、1989年刊〕に記載の方法に従って行った。すなわち、それぞれのDNA試料について1%アガロースゲル電気泳動を行ない、泳動後、アルカリ変性を行ないナイロンメンブレン（ハイボンド-N、アマシャム社製）に一晩サザンブロットした。紫外線トランスイルミネーター（254 nm）に3分間照射させ、DNAを固定した。このメンブレンをプレハイブリダイゼーション緩衝液（5 \times デンハルト液、6 \times SSC、0.1% SDS、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子DNA）5 ml中で50℃、2時間プレハイブリダイゼーションを行なった。次いでプローブを加え、50℃で一晩ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションの後、メンブレンを2 \times SSC、0.1% SDSを含む洗浄液で室温10分間2回洗浄し、続いて同じ洗浄液で50℃、30分間で2回洗浄した。メンブレンは乾燥させた後、X線フィルム（コダック社製）を入れたカセット内で-80℃一晩感光させ、オートラジオグラフィーをとった。形質転換を行っていない株（i）、pKC22を導入した形質転換体（ii）、ベクターのみを導入した形質転換体（iii）について、サザンハイブリダイゼーションにより検出されたシグナルのパターンを比較した。

【0106】（ii）には、（i）、（ii）、（iii）共通の内在性のシグナルのほかに、EcoRIで切断したサンプルでは約1.6 kbpと0.7 kbp、HindIIIで切断したサンプルでは約6 kbpの位置に特異的なシグナルが観察され、目的遺伝子が（2）に組み込まれていることが観察された。

【0107】実施例4 形質転換体と野性型の背丈の比較

野性型シロイヌナズナおよび実施例3で調製した形質転換されたシロイヌナズナの種子を100粒ずつ水を含

む、紙上に載せ、4℃で2日間吸水させた。その後、約25鉢に3粒ずつ播種した。栽培にはパーライトとバーミキュライトを1:1に混合したものを入れたロックウールミニポットを使用した。ハイポネックス（村上産業）を含む水を与え、22℃の栽培室で連続光の下で栽培した。播種後はほぼ同時期に発芽した。播種後、10日目で一番生育のよいものを残し、残り2本を間引いた。その後、背丈（花茎の長さ）の経時変化を測定した。花茎が出てからの日数と背丈のグラフを図11に示した。図中、nは反復の数（サンプル数）を示す。成長が停止した播種後、51日目の背丈を比較したところ、センス型のpBI35S-22(+)をもつ形質転換体は野性型に比べて背丈が増大しており、アンチセンス型のpBI35S-22(-)をもつ形質転換体は同等もしくは減少していた。野性型シロイヌナズナと形質転換体の写真を図12に示す。

配列

```

GAATCCCCCT CCTCTTTGT TGTGAAGAAA AAAATGGTTG GGCTGTTAG GTTGGTGAGT   60
GGGTGTCCGG GACCAAGTGG CTTTGGTTCA GCCTCCACCG CCCAAGAGGT TACCGAAGGG   120
ATTGATGGAA CCAACTTGAC TGCTCTAGTT ACCGGAGGAG CAAGTGGAAT TGGGTTGGAA   180
ACTTCTAGAG TATTGGCTCT TCGTGGAGTC CACGTCATCA TCGGTGCAAG GAACATGAAA   240
GCCGCGAATG AAGCAAAGAA CAAAATTGTT AGAGAGAACC CAAGAGCCCG TATAGATGTT   300
CTGGAGCTGG ATCTTTGCTC TACTAATTCA ATCAGATCAT TTGCCGACAA TTTCAATTGCT   360
CTTCATCTTC CTCTCAATAT CTTAATAAAC AATGCTGGCA TCATGTTTG TCCCTTTCAG   420
CTTTCTCAAA ATGGATTAGA GGTGCAGTTT GCAACTAATC ATATAGGACA TTTCTCTTA   480
ACAAACCTTC TACTGGACAC AATGAAGAAC ACAGTTAAAG CAACTGGGAT CCAAGGAAGG   540
GTTGTCAACT TATCATCAAT AGCTCACAAC TACTGTTATA AGAAAGGGAT CCGATTTTCAT   600
AAGATCAATG ACAAGCAAGG ATACAGTGAG AAAAGAGCAT ATGGGCAGTC CAAATTAGCA   660
AATATATTGC ATGCCAATGA ACTCTCTCGT CGGTTGCAGG AGGAGGGTGT GAACATCACA   720
GTAAATTCGG TTCACCCGGG ATTGATTATG ACGCCTCTGT TTAGACACTC CGCTGATCTG   780
ATGAAACTTT TGAAGTTCTT CAGTTTCTTT CTCTGGAAGA ACGTTCCTCA GGGGGCAGCT   840
ACGACGTGCT ACGTCGCGCT CCACCCGCGA CTCAATGGGG TGACCGGAAA ATACTTTTCG   900
GACTGCAATG AGATGAGACC AAGTTCATAT GCTAGAAATG AGTCCTTGGG AAGGGAGCTT   960
TGGGAATTCA GTAACAAATT GATTAGCTCA GTTTCAGAAC CTAACTCAG ATCATCACCT  1020
CTCTTTCCAA ATGGCAAAAA AAAAAAAAAA TTGCACCTAC GTATTTTCAC ATTAATGGG   1080
GTTTCCTCCA TGGCATGGCA TGAATGAAGG GATGATTTTC AGCATGGGAA ATCTTGAAGC  1140
ATAATAATAA GCTTAAAGTG CCTTTACTT TCTCGTTTTC GTGTTAAAGG CATCATACTA  1200
TCATAGCAGT TGGTTTCCTA ATATGTGTGA ATTTTCAGTG TTTCAAAGGA ATAAAATTCT  1260
TTCTATATTA TTCATATTAG TTTATTTTAT ACGGATTAAT TATTGTATGT ATCATTTTAA  1320
TTATATTATA ATCATATTAT TCAATATACA TATTCTTACT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA  1378

```

【0109】配列番号：2

配列の長さ：323

配列の形：アミノ酸

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ゴシビウム バルバデンセ (Gossypium barbad

配列

```

Met Val Gly Leu Phe Arg Leu Val Ser Gly Cys Pro Gly Pro Ser Gly
          5              10              15
Phe Gly Ser Ala Ser Thr Ala Gln Glu Val Thr Glu Gly Ile Asp Gly

```

【0108】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1378

配列の形：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ゴシビウム バルバデンセ (Gossypium barbadense)

組織の種類：ワタ繊維

直接の起源

ライブラリー名：ワタ繊維組織由来cDNAライブラリー

クローン名：KC18

ense)

組織の種類：ワタ繊維

直接の起源

ライブラリー名：ワタ繊維由来cDNAライブラリー

クローン名：KC18

```

                20                25                30
Thr Asn Leu Thr Ala Leu Val Thr Gly Gly Ala Ser Gly Ile Gly Leu
                35                40                45
Glu Thr Ser Arg Val Leu Ala Leu Arg Gly Val His Val Ile Ile Gly
                50                55                60
Ala Arg Asn Met Lys Ala Ala Asn Glu Ala Lys Asn Lys Ile Val Arg
                65                70                75                80
Glu Asn Pro Arg Ala Arg Ile Asp Val Leu Glu Leu Asp Leu Cys Ser
                85                90                95
Thr Asn Ser Ile Arg Ser Phe Ala Asp Asn Phe Ile Ala Leu His Leu
                100                105                110
Pro Leu Asn Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Ile Met Phe Cys Pro Phe
                115                120                125
Gln Leu Ser Gln Asn Gly Leu Glu Val Gln Phe Ala Thr Asn His Ile
                130                135                140
Gly His Phe Leu Leu Thr Asn Leu Leu Leu Asp Thr Met Lys Asn Thr
                145                150                155                160
Val Lys Ala Thr Gly Ile Gln Gly Arg Val Val Asn Leu Ser Ser Ile
                165                170                175
Ala His Asn Tyr Cys Tyr Lys Lys Gly Ile Arg Phe His Lys Ile Asn
                180                185                190
Asp Lys Gln Gly Tyr Ser Glu Lys Arg Ala Tyr Gly Gln Ser Lys Leu
                195                200                205
Ala Asn Ile Leu His Ala Asn Glu Leu Ser Arg Arg Leu Gln Glu Glu
                210                215                220
Gly Val Asn Ile Thr Val Asn Ser Val His Pro Gly Leu Ile Met Thr
                225                230                235                240
Pro Leu Phe Arg His Ser Ala Asp Leu Met Lys Leu Leu Lys Phe Phe
                245                250                255
Ser Phe Phe Leu Trp Lys Asn Val Pro Gln Gly Ala Ala Thr Thr Cys
                260                265                270
Tyr Val Ala Leu His Pro Arg Leu Asn Gly Val Thr Gly Lys Tyr Phe
                275                280                285
Ala Asp Cys Asn Glu Met Arg Pro Ser Ser Tyr Ala Arg Asn Glu Ser
                290                295                300
Leu Gly Arg Glu Leu Trp Glu Phe Ser Asn Lys Leu Ile Ser Ser Val
                305                310                315                320
Ser Glu Pro
                323

```

【0110】配列番号：3

配列の長さ：1035

配列の形：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ゴシピウム バルバデンセ (Gossypium barbadense)

組織の種類：ワタ繊維

直接の起源

ライブラリー名：ワタ繊維組織由来cDNAライブラリー

クローン名：KC22

配列

```

CAATAATTCT CTCTGTTTCT CTGGTTTAAA CATGGGTATG GGTTTAAGGA ATGGATTCT 60
TTTGATTTTA TCTTGTGTTG TTACACTTTC CCTCTCAGTT TTGGGGCGAC CTGCCACTTT 120
CCTTGAAGAT TTTAGAATCA CTTGGTCTGA TTCTCATATT AGGCAAATCG ATGGAGGGAG 180

```

```

AGCCATCCAA CTTGTTCTCG ACCAAAATTC AGGCTGTGGA TTTGCTTCTA AAAGGCAGTA 240
TTTGTTCGGA CGTGTCAAGCA TGAAATCAA GCTCATCCCC GGCGACTCCG CCGGAACAGT 300
CACCGCCTTT TATATGAATT CTGTTACAGA TGCTGTGCGA GATGAGCTAG ACTTCGAGTT 360
CTTGGGAAAC CGTACCGGGC AGCCATATAC GGTTCAAACC AATATCTATG CCCATGGAAA 420
GGGTGACAGG GAACAAAGGG TTAACCTTTG GTTCGATCCT GCTGCAGATT TCCATACTTA 480
CTCAATCATG TGAACCATC ATCAGATTGT GTTCTATATT GATGAAGTGC CAATTAGGGT 540
TTATAAGAAC AATGAAGCTA GAAATATCCC ATACCCAAAA CTCCAGCCAA TGGGAGTTTA 600
TTCAACGCTG TGGGAGGCTG ATGATTGGGC AACAAGGGGA GGTTTAGAGA AAATTGATTG 660
GACCAAGGCT CCGTTCTTAG CTTATTACAA GGACTTCGAC ATTGAAGGAT GTCCGGTTCC 720
AGGGCCAGTA AACTGTGCCA CAAACAGTAG GAAGTGGTGG GAGGGCACTG CTTATCAAGC 780
CCTTAATGCC ATGGAAGCTA AAAGATATAG TTGGGTTCGT ATGAACCACG TGATATACGA 840
TTACTGCACC GACAAGTCCC GTTACCCGGT TACCCACCG GAGTGCATGT CCATCATCTG 900
AAAATCCAAA CCAAGTGAA GTTTCGTGTC CTATTTTACG TACATATGTA CCTCCCTTTA 960
TACAAATAAT AGAGCCATGC AAAAATTGGG TTTTAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1020
AAAAAAAAAA AAAAAA                                     1035

```

【 0 1 1 1 】配列番号：4

配列の長さ：289

配列の形：アミノ酸配列

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ゴシビウム バルバデンセ (Gossypium barbad

ense)

組織の種類：ワタ繊維

直接の起源：

ライブラリー名：ワタ繊維由来cDNAライブラリー

クローン名：KC22

配列

```

Met Gly Met Gly Leu Arg Asn Gly Phe Leu Leu Ile Leu Ser Cys Val
      5              10              15
Val Thr Leu Ser Leu Ser Val Leu Gly Arg Pro Ala Thr Phe Leu Glu
      20              25              30
Asp Phe Arg Ile Thr Trp Ser Asp Ser His Ile Arg Gln Ile Asp Gly
      35              40              45
Gly Arg Ala Ile Gln Leu Val Leu Asp Gln Asn Ser Gly Cys Gly Phe
      50              55              60
Ala Ser Lys Arg Gln Tyr Leu Phe Gly Arg Val Ser Met Lys Ile Lys
      65              70              75              80
Leu Ile Pro Gly Asp Ser Ala Gly Thr Val Thr Ala Phe Tyr Met Asn
      85              90              95
Ser Val Thr Asp Ala Val Arg Asp Glu Leu Asp Phe Glu Phe Leu Gly
      100             105             110
Asn Arg Thr Gly Gln Pro Tyr Thr Val Gln Thr Asn Ile Tyr Ala His
      115             120             125
Gly Lys Gly Asp Arg Glu Gln Arg Val Asn Leu Trp Phe Asp Pro Ala
      130             135             140
Ala Asp Phe His Thr Tyr Ser Ile Met Trp Asn His His Gln Ile Val
      145             150             155             160
Phe Tyr Ile Asp Glu Val Pro Ile Arg Val Tyr Lys Asn Asn Glu Ala
      165             170             175
Arg Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Leu Gln Pro Met Gly Val Tyr Ser Thr
      180             185             190
Leu Trp Glu Ala Asp Asp Trp Ala Thr Arg Gly Gly Leu Glu Lys Ile
      195             200             205
Asp Trp Thr Lys Ala Pro Phe Leu Ala Tyr Tyr Lys Asp Phe Asp Ile
      210             215             220

```

Glu Gly Cys Pro Val Pro Gly Pro Val Asn Cys Ala Thr Asn Ser Arg
 225 230 235 240
 Asn Trp Trp Glu Gly Thr Ala Tyr Gln Ala Leu Asn Ala Met Glu Ala
 245 250 255
 Lys Arg Tyr Ser Trp Val Arg Met Asn His Val Ile Tyr Asp Tyr Cys
 260 265 270
 Thr Asp Lys Ser Arg Tyr Pro Val Thr Pro Pro Glu Cys Met Ser Ile
 275 280 285
 Ile
 289

【0112】配列番号：5

配列の長さ：1041

配列の形：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ゴシビウム バルバデンセ (Gossypium barbadense)

組織の種類：ワタ繊維

直接の起源

ライブラリー名：繊維組織由来cDNAライブラリー

クローン名：KC03

配列

ATGGCTTTCA AAGCTCTGCT GCTGTTACTA TTGGCCACTT TTCTGCTTGT TTCAACAACA 60
 GTTGCTTCCA ATGAAGTGGG AGTGAAGACT GAGATTAAAT ATGCTGCTCC TGTTCAGTGT 120
 AAGGCACCTA TCCCTGCTCC ACCCGTTAAG CCTCCCACCA CTCGGTGCC GCCGTACAAG 180
 GCTCCAACCT CAGCACCCCC AACTAAGGGC CCCACTCCAT ATAAACCCCC TACCAAGGCC 240
 CCCACTCCAC CATATAAACC ACCAACCAAG GCTCCTACTC CACCATATAA ACCCCAGCT 300
 CCTGCACCAC CAACCAAGGC TCCTACTCCA CCATATAAGC CCCAGCTCC TGCACCACCA 360
 ACCAAGGCTC TACTCCACC ATATAAGCCC CCAGCTCCTG CACCACCAAC CAAGGCTCCA 420
 ACTCCACCAT TTAAGCCCC AGCACCAGCA CCACCAACCA AGGCTCCTAC TCCCCCATAT 480
 AAACCCCTA CTCCCGCACC GGCACCTCCA GTCAAGGCC CTACTCCCC ATATATGCC 540
 CCAACACCCC CAACCAAGC ACCAACTCCA GCACCAGCAC CGCCAATAA AGCACCAACT 600
 CCCCCATATA AGCCCCAGT TCCTACACCT CCAGTTAAGC CACCAACAAC TCCAGCACCG 660
 CCTTACAAGC CACCAAGTCC ACCATTGCCA CCTGTTAGGA CAAAAAGGA TTGCATCCCA 720
 TTATGTGGAC AAAGGTGCAA ATTACACTCA AGGACTAACC TATGCTTGAG AGCTTGCAATG 780
 ACATGCTGTG ACAGATGCAA ATGTGTCCCA CCAGGACAT ATGGCAACAG GGAATGTGT 840
 GGCAATGTT ATACTGATAT GAGAACCAC CGCAACAAGC ACAAATGTCC TTGAAAAGCC 900
 CAACCAAGC CCCCCAAAA CGACACTTCT TGAGTATGTG TTTTTCATAT TTGTAATAGC 960
 AAAAAAGCTT GCAGTAATAA GTTCTGTAAG AAGAGAGGAA ATGGATGGAT TTCTGTAGT 1020
 GTCAAAAAAA AAAAAAAAAA A 1041

【0113】配列番号：6

配列の長さ：297

配列の形：アミノ酸

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ゴシビウム バルバデンセ (Gossypium barbadense)

ense)

組織の種類：ワタ繊維

直接の起源

ライブラリー名：繊維組織由来cDNAライブラリー

クローン名：KC03

配列

Met Ala Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ala Thr Phe Leu Leu
 5 10 15
 Val Ser Thr Thr Val Ala Ser Asn Glu Val Gly Val Lys Thr Glu Ile
 20 25 30
 Lys Tyr Ala Ala Pro Val Pro Val Lys Ala Pro Ile Pro Ala Pro Pro
 35 40 45
 Val Lys Pro Pro Thr Thr Pro Val Pro Pro Tyr Lys Ala Pro Thr Pro

50	55	60
Ala Pro Pro Thr Lys Gly	Pro Thr Pro Tyr Lys	Pro Pro Thr Lys Ala
65	70	75
Pro Thr Pro Pro Tyr Lys	Pro Pro Thr Lys Ala	Pro Thr Pro Pro Tyr
85	90	95
Lys Pro Pro Ala Pro Ala	Pro Pro Thr Lys Ala	Pro Thr Pro Pro Tyr
100	105	110
Lys Pro Pro Ala Pro Ala	Pro Pro Thr Lys Ala	Pro Thr Pro Pro Tyr
115	120	125
Lys Pro Pro Ala Pro Ala	Pro Pro Thr Lys Ala	Pro Thr Pro Pro Phe
130	135	140
Lys Pro Pro Ala Pro Ala	Pro Pro Thr Lys Ala	Pro Thr Pro Pro Tyr
145	150	155
Lys Pro Pro Thr Pro Ala	Pro Ala Pro Pro Val	Lys Ala Pro Thr Pro
165	170	175
Pro Tyr Met Pro Pro Thr	Pro Pro Thr Lys Ala	Pro Thr Pro Ala Pro
180	185	190
Ala Pro Pro Thr Lys Ala	Pro Thr Pro Pro Tyr	Lys Pro Pro Val Pro
195	200	205
Thr Pro Pro Val Lys Pro	Pro Thr Thr Pro Ala	Pro Pro Tyr Lys Pro
210	215	220
Pro Ser Pro Pro Leu Pro	Pro Val Arg Thr Lys	Lys Asp Cys Ile Pro
225	230	235
Leu Cys Gly Gln Arg Cys	Lys Leu His Ser Arg	Thr Asn Leu Cys Leu
245	250	255
Arg Ala Cys Met Thr Cys	Cys Asp Arg Cys Lys	Cys Val Pro Pro Gly
260	265	270
Thr Tyr Gly Asn Arg Glu	Met Cys Gly Lys Cys	Tyr Thr Asp Met Arg
275	280	285
Thr His Arg Asn Lys His	Lys Cys Pro	
290	295	

【0114】配列番号：7

配列の長さ：713

配列の形：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ゴシビウム ヒルスツム (*Gossypium hirsutum*)

組織の種類：ワタ繊維

直接の起源：

ライブラリー名：繊維組織特異的 cDNA ライブラリー

クローン名：Gh2

配列

```

GCACGACGCG TTTGCGATTT CGTCTTTCTC TCTCCAATGG CTTCTATTGC TGGTTCATCC 60
ATCTCCATGC AACCTTGCCC CTTTGCTAAA GGCAGTGTTT CCGGGTTGAA ATTGGGTTCA 120
TTTATGAACC AGGGAAGAAG CACCCTCTCA TTTACGATGC GTCCAATGCC TGCTCGCTTG 180
CAGATCTGCT GTGCTGCCAA ACAAGAGACC GTGGATAAGG TATGTGAAGT AGTAAAGAGA 240
CAATTACCTT TACACAATGA CAAACCAATC ACCGGTGAAT CAACATTCTT TGATCTTGGA 300
GCTGATTCTC TTGATACGGT TGAGATTGTG TTGGGACTTG AGGAAGAATT CGGAATCACG 360
GTGGAAGAGG ACAACGCACA ATCCATCACA ACTGTTCAAG ATGCTGCAGA ACTTCTTGAG 420
AAGCTGTGCA GTGAGAAAAG TGCCTAGAAA ACAAGGATCG CAGTTGGTTG GTTTATTTGC 480
CGATATTTGA TATTCACATA CTAGACCGCA AACCCGGGGG AAATCATGTG TGAACTTTAA 540
TTATGTTGAA TATGTAGGAA ATTTGTAAT AAAGTTGTTG GGATTCTTAG TTAAATTGTG 600
GAACCTAAAA TGTGTCATTT CGTTTTACCG TAGTGTTTAA TGTAGAAGTT TTTTGTTTAA 660

```

【0115】配列番号：8

配列の長さ：136

配列の形：アミノ酸配列

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ゴシピウム ヒルスツム (Gossypium hirsutu

m)

組織の種類：ワタ繊維

直接の起源：

ライブラリー名：繊維組織特異的 cDNA ライブラリー

クローン名: Gh2

Met	Ala	Ser	Ile	Ala	Gly	Ser	Ser	Ile	Ser	Met	Gln	Pro	Cys	Pro	Phe	
				5					10					15		
Ala	Lys	Gly	Ser	Val	Ser	Gly	Leu	Lys	Leu	Gly	Ser	Phe	Met	Asn	Gln	
				20					25					30		
Gly	Arg	Ser	Thr	Leu	Ser	Phe	Thr	Met	Arg	Phe	Met	Phe	Ala	Arg	Leu	
				35					40					45		
Gln	Leu	Cys	Cys	Ala	Ala	Lys	Gln	Glu	Thr	Val	Asp	Lys	Val	Cys	Glu	
				50					55					60		
Val	Val	Lys	Arg	Gln	Leu	Pro	Leu	His	Asn	Asp	Lys	Pro	Ile	Thr	Gly	
				65					70					75		
Glu	Ser	Thr	Thr	Leu	Asp	Lys	Gly	Ala	Asp	Ser	Leu	Asp	Thr	Val	Glu	
				85					90					95		
Ile	Val	Leu	Gly	Leu	Glu	Glu	Glu	Phe	Gly	Ile	Thr	Val	Glu	Glu	Asp	
				100					105					110		
Asn	Ala	Gln	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Val	Gln	Asp	Ala	Ala	Glu	Leu	Leu	Glu	
				115					120					125		
Lys	Leu	Cys	Ser	Glu	Lys	Ser	Ala									
				130					135							

【0116】配列番号：9

配列の長さ：1312

配列の形：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名：ゴシピウム ヒルスツム (*Gossypium hirsutum*)

組織の種類：ワタ繊維

直接の起源

ライブラリー名：繊維組織特異的 cDNA ライブラリー

クローン名：Gh3

配列

GAAGAATTCG	CCAAACCACG	CTAACCCAAA	ACACAAGAAA	AAGAAAGAAA	GAAAAA AAAA	60
AGGGAATACC	CCTTACCTTC	ATAGAGAGAA	CAAGAGAAAC	AAAGCAAGGT	ATTTT TTTTC	120
TTCACCTGTA	AAAATGGCGT	CGGCGAGTAC	TTGGATATTG	TCGCTAAAGT	TACTTTTAAT	180
TTCTACCGGT	ATATTGGGTA	TAGCTTTAGG	ACTTAAATC	TCTGTTCCAT	TGGTTT TGG	240
AATTCTCTGT	TTCTCAAGCT	CCGTTATGGT	GGAGTGGTTT	CCGTTCTTTG	GCTCAAGCCT	300
CCATATCTTT	ACCGTCGTCA	TCAACGGGAT	CATCATCACA	ATAGCAGCAT	CGTCGCGGTT	360
TAACCAAAAC	AACGGCGAGA	AAGATCAGAT	GGAGCAGATG	CAACCGCGGC	CGAAGATCTC	420
GGAGGATCAA	CAACCAATTG	TGGAGTATGA	TACAAAGAGC	GGGTGGGGCT	CCGACGCAGT	480
GGAATCCAGT	GATTTCTGT	ACGAGGAAAA	TCAGAGAGGA	GAAGAGGTGG	CAACCAGGGT	540
CTCCGAGGAG	GAGAGCAATG	TGGCGGTTGA	AGATGACAGA	GATGGAACG	AGTTTGTTAT	600
CTCTAAGTCG	GAGTGGATTG	CTCCAAGTAG	AACGGATTCT	TCGGAGATTG	CGTTGGATGC	660
TCTGCTTATA	CAGGAGAAAC	CTGCTCCTTC	TTCTAGATCC	GGTCACCGGA	AACCTGTTAA	720
AGTCAATCCC	GAAGGTGGGC	GAGCGTTGAA	AGCGCGAAGC	CAAAACGGCA	TGAGACGCTG	780
GCAAAAACAC	TTGGAAGATG	ATAAACGGAG	GGGAAATCAA	TGCCGTGTGC	CAGACACTTG	840
AAGAAGTCGG	ACACGTGGGA	GAATCACGGC	CGTGATATCA	ACGTGGAGGC	ATTGACCAGC	900
TCCCCTCTGA	TGAAGAAATC	GGAACGTTTC	AGAGACCGGA	CCAATTACCA	GCTGCCACCC	960
GAACAAGTAA	GCTCTTTCCC	GGCTTCAGGA	AAGCTGAGAA	AAGAACCCTC	GCTGAGACAG	1020

クローン名: Gh3

hirsutum) から抽出されたRNAの電気泳動の結果を示

す写真である。

【図10】プラスミドpBI35S-22(+)の構築を示す図である。

【図11】KC22遺伝子構築物を発現する、トランスジェニック・シロイヌナズナおよび未形質転換のシロイヌナズナの花茎長(長さ)の経時的变化を示す図であ

る。

【図12】野性型植物とセンス型のpBI35S-22(+)を含む形質転換植物、アンチセンス型のpBI35S-22(-)を含む形質転換植物の生物の形態を示す写真。

【図1】

NORTHERN BLOTTING

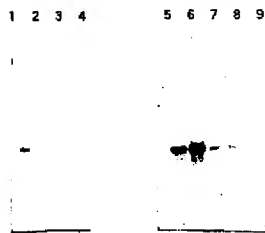


FIG. 1 Tissue specificity of KC18 gene expression

1. 10DPA INTACT OVULE
2. MATURE SEED
3. 18DAYS SEEDLING
4. LEAF
5. 10DPA INTACT OVULE
6. 14DPA FIBER
7. 14DPA STRIPPED OVULE
8. 22DPA FIBER
9. 22DPA STRIPPED OVULE

【図2】

NORTHERN BLOTTING

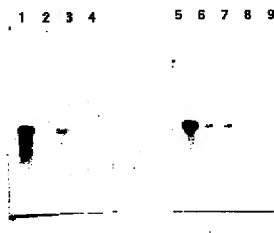


FIG. 2 Tissue specificity of KC22 gene expression

1. 10DPA INTACT OVULE
2. MATURE SEED
3. 18DAYS SEEDLING
4. LEAF
5. 10DPA INTACT OVULE
6. 14DPA FIBER
7. 14DPA STRIPPED OVULE
8. 22DPA FIBER
9. 22DPA STRIPPED OVULE

【図3】

NORTHERN BLOTTING

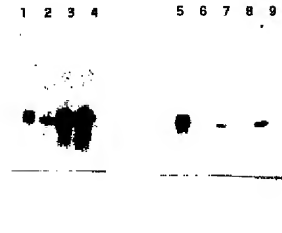
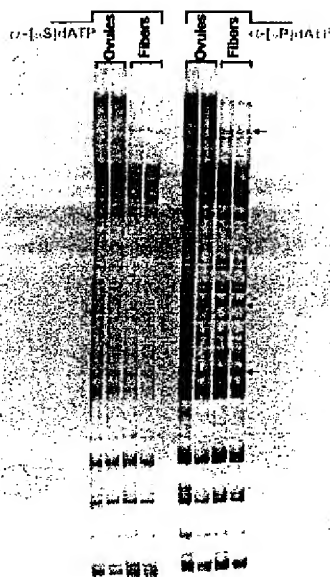


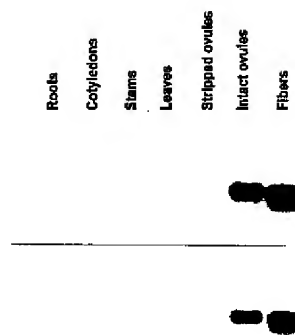
FIG. 3 Tissue specificity of KC03 gene expression

1. 10DPA INTACT OVULE
2. MATURE SEED
3. 18DAYS SEEDLING
4. LEAF
5. 10DPA INTACT OVULE
6. 14DPA FIBER
7. 14DPA STRIPPED OVULE
8. 22DPA FIBER
9. 22DPA STRIPPED OVULE

【図4】

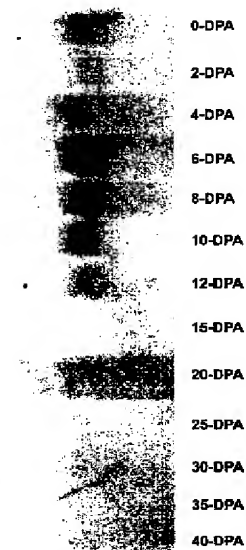


【図5】



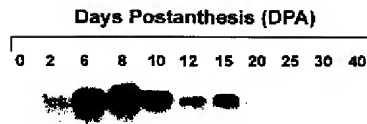
RNA blot analysis of differential tissues.

【図8】



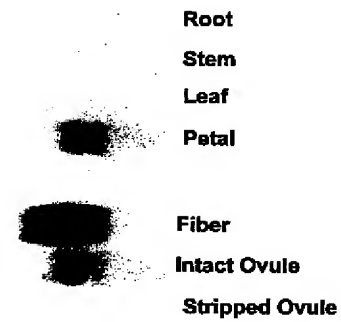
Accumulation of Gh-3 mRNA in Different Ages of Cotton Ovules

【図6】



RNA blot analysis of intact ovules at different days after anthesis.

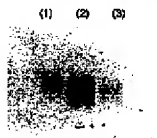
【図7】



Accumulation of Gh-3 mRNA

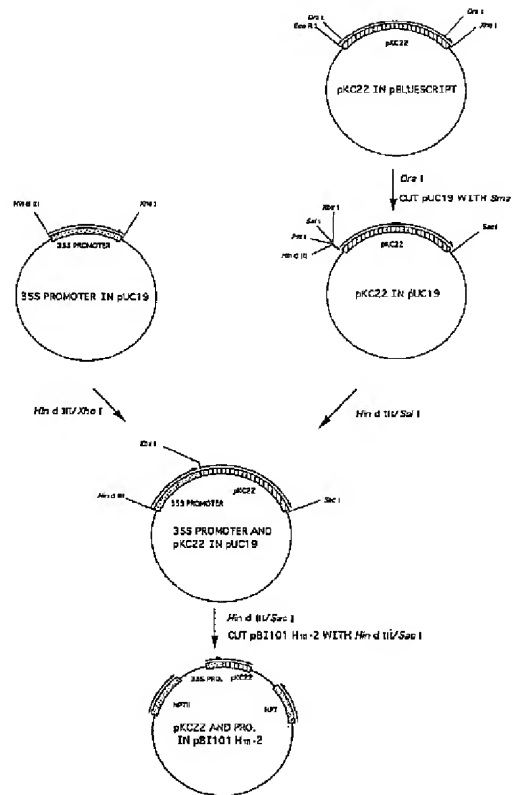
【図9】

Northern Analysis: pKC22
RNA: 7 Days Post Anthesis



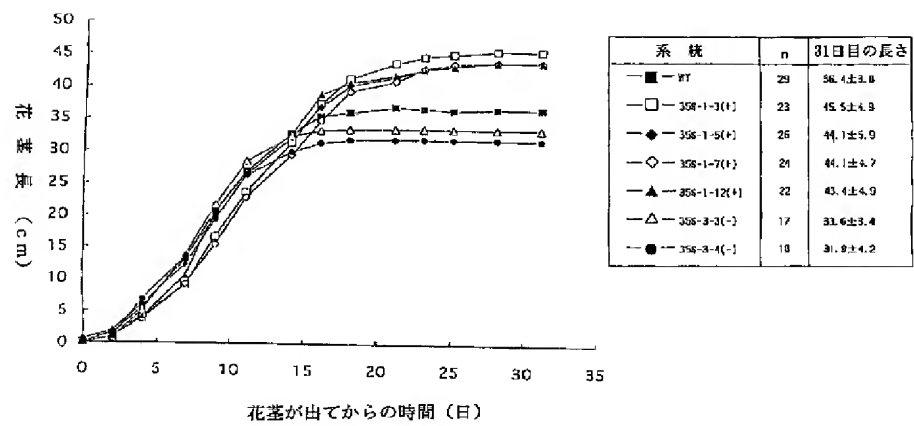
- 1) In vivo fiber RNA from Coker-312
- 2) in vitro fiber RNA with 10^{-6} M Brassinolide
- 3) In vitro fiber RNA control

【図10】



CONSTRUCTION OF pBI355-22

【図11】



【図12】

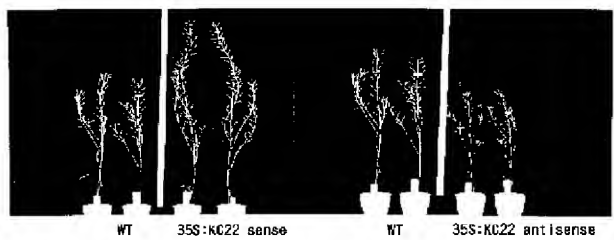


Fig. 7 Photographs of typical transgenic *Arabidopsis thaliana* WS plants at 8 weeks
(A) Right; transgenic 1-5 (35S:KC22 sense) and left: wild type
(B) Right; transgenic 3-4 (35S:KC22 antisense) and left: wild type

【手続補正書】

【提出日】平成8年2月28日

【手続補正1】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】

図面代用写真

NORTHERN BLOTTING

1 2 3 4 5 6 7 8 9

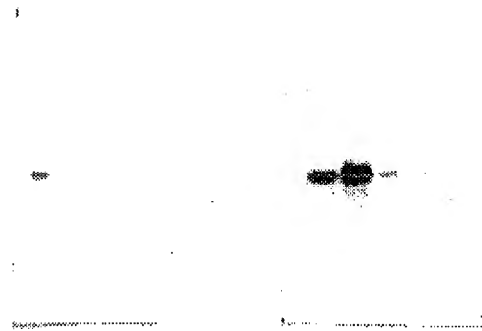


FIG. 1 Tissue specificity of KC18 gene expression

1. 100PA INTACT OVULE
2. MATURE SEED
3. 18DAYS SEEDLING
4. LEAF
5. 100PA INTACT OVULE
6. 140PA FIBER
7. 140PA STRIPPED OVULE
8. 220PA FIBER
9. 220PA STRIPPED OVULE

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正内容】

【図2】

図面代用写真

NORTHERN BLOTTING

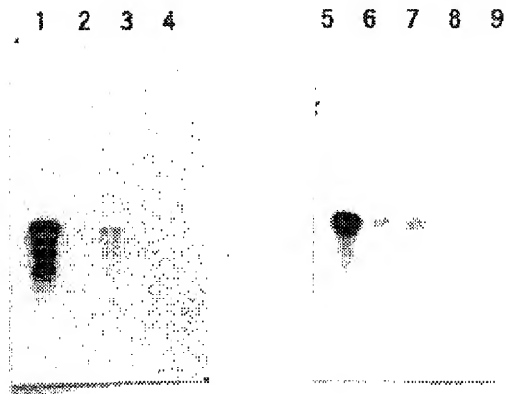


FIG. 2 Tissue specificity of KC22 gene expression

1. 100DPA INTACT OVULE
2. MATURE SEED
3. 180DAYS SEEDLING
4. LEAF
5. 100DPA INTACT OVULE
6. 140DPA FIBER
7. 140DPA STRIPPED OVULE
8. 220DPA FIBER
9. 220DPA STRIPPED OVULE

【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図3

【補正方法】変更

【補正内容】

【図3】

図面代用写真

NORTHERN BLOTTING

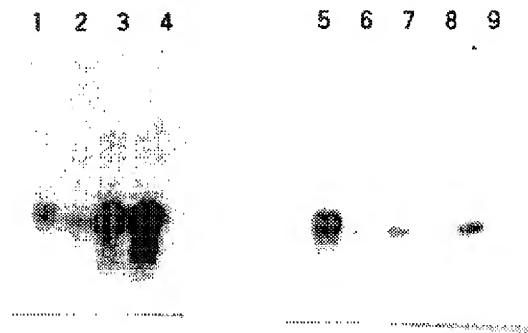


FIG. 3 Tissue specificity of KC03 gene expression

1. 10DPA INTACT OVULE
2. MATURE SEED
3. 18DAYS SEEDLING
4. LEAF
5. 10DPA INTACT OVULE
6. 14DPA FIBER
7. 14DPA STRIPPED OVULE
8. 22DPA FIBER
9. 22DPA STRIPPED OVULE

【手続補正4】

【補正対象書類名】図面

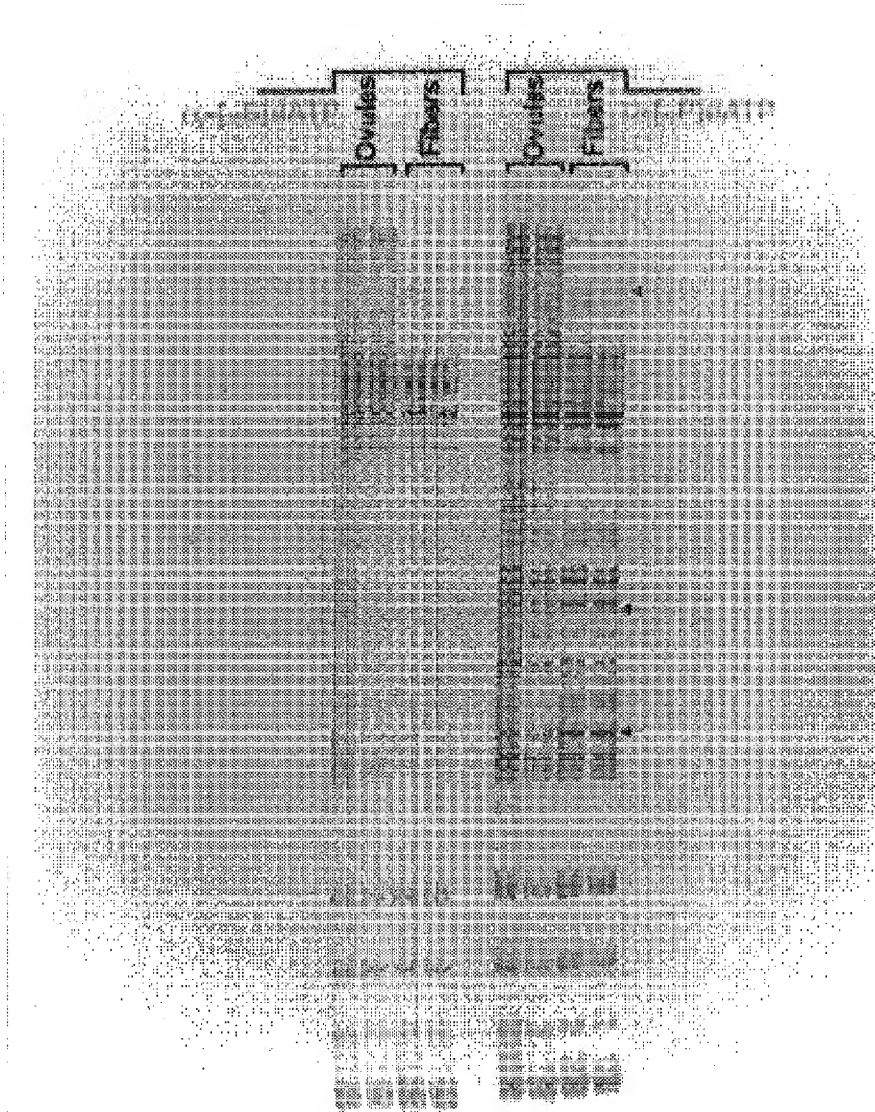
【補正対象項目名】図4

【補正方法】変更

【補正内容】

【図4】

図面代用写真



【手続補正5】

【補正対象書類名】図面

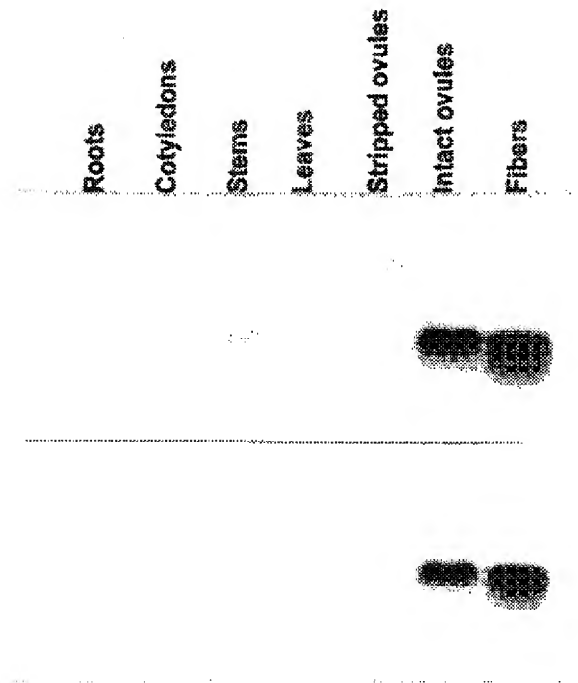
【補正対象項目名】図5

【補正方法】変更

【補正内容】

【図5】

図面代用写真

**RNA blot analysis of differential tissues.**

【手続補正6】

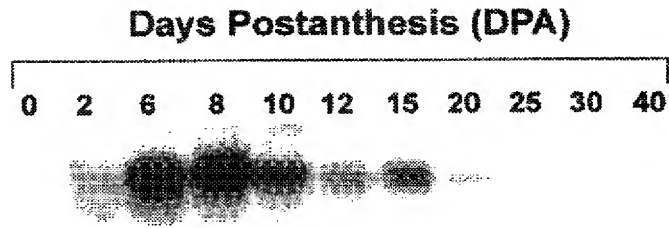
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図6

【補正方法】変更

【補正内容】

【図6】



図面代用写真

RNA blot analysis of intact ovules at different days after anthesis.

【手続補正7】

【補正対象書類名】図面

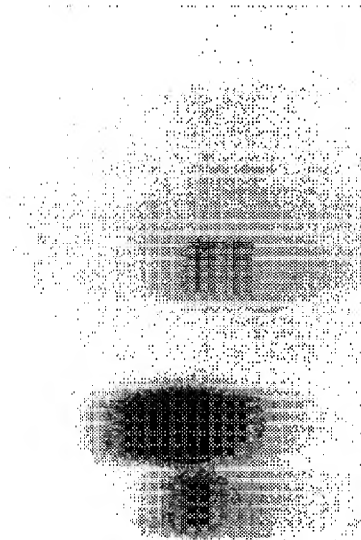
【補正対象項目名】図7

【補正方法】変更

【補正内容】

【図7】

図面代用写真



Root

Stem

Leaf

Petal

Fiber

Intact Ovule

Stripped Ovule

Accumulation of Gh-3 mRNA

【手続補正8】

【補正対象書類名】図面

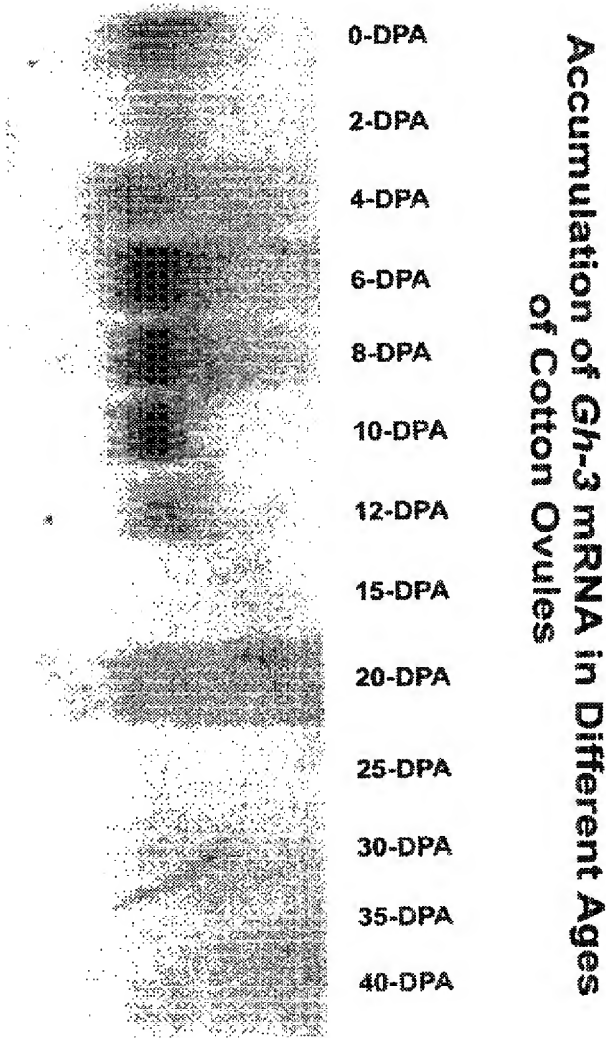
【補正対象項目名】図8

【補正方法】変更

【補正内容】

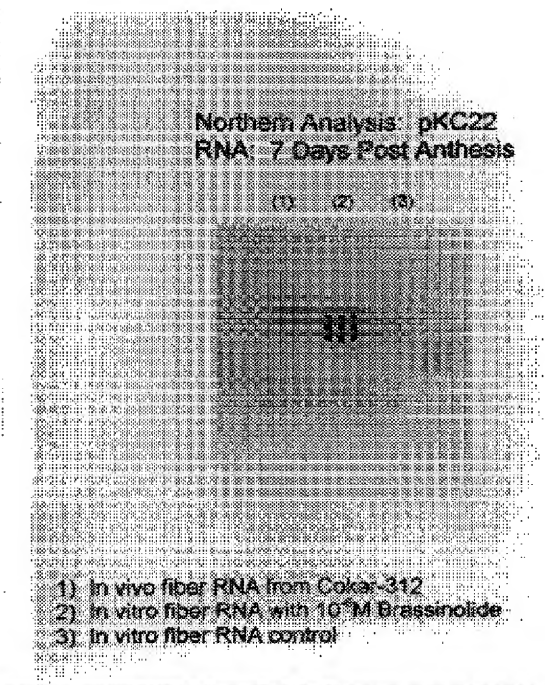
【図8】

図面代用写真

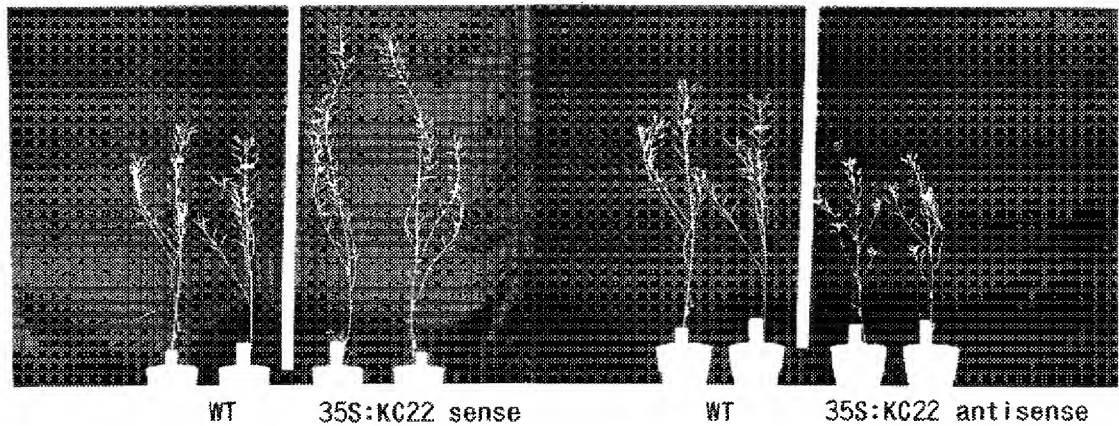


【手続補正 9】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図 9
【補正方法】変更
【補正内容】
【図 9】

図面代用写真



【手続補正10】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図12
【補正方法】変更
【補正内容】
【図12】



図面代用写真

Fig. 7 Photographs of typical transgenic *Arabidopsis thaliana* WS plants at 8 weeks
(A) Right; transgenic 1-5 (35S:KC22 sense) and left; wild type
(B) Right; transgenic 3-4 (35S:KC22 antisense) and left; wild type

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 K 14/415			C 07 K 14/415	
C 12 N 1/21			C 12 N 1/21	
5/10			C 12 P 21/02	C

	15/02		9453-4B	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 P	21/02			C 1 2 N	5/00	C
C 1 2 Q	1/68		9162-4B		15/00	B
//(C 1 2 N	15/09	Z N A				
C 1 2 R	1:91)					
(C 1 2 N	1/21					
C 1 2 R	1:19)					
(C 1 2 P	21/02					
C 1 2 R	1:91)					

(72)発明者 藤澤 浩一
滋賀県大津市堅田二丁目 1 番 1 号 東洋紡
績株式会社総合研究所内

(72)発明者 西口 進
滋賀県大津市堅田二丁目 1 番 1 号 東洋紡
績株式会社総合研究所内

(72)発明者 前川 宣彦
滋賀県大津市堅田二丁目 1 番 1 号 東洋紡
績株式会社総合研究所内

(72)発明者 ランディ アレン
アメリカ合衆国 テキサス州 ラブボッ
ク, フォーティース ストリート 3104番
地